

DOSAGE DU ZINC DANS LE SERUM PAR DILUTION ISOTOPIQUE SUBSTOECHIMETRIQUE

Thèse

présentée à la faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

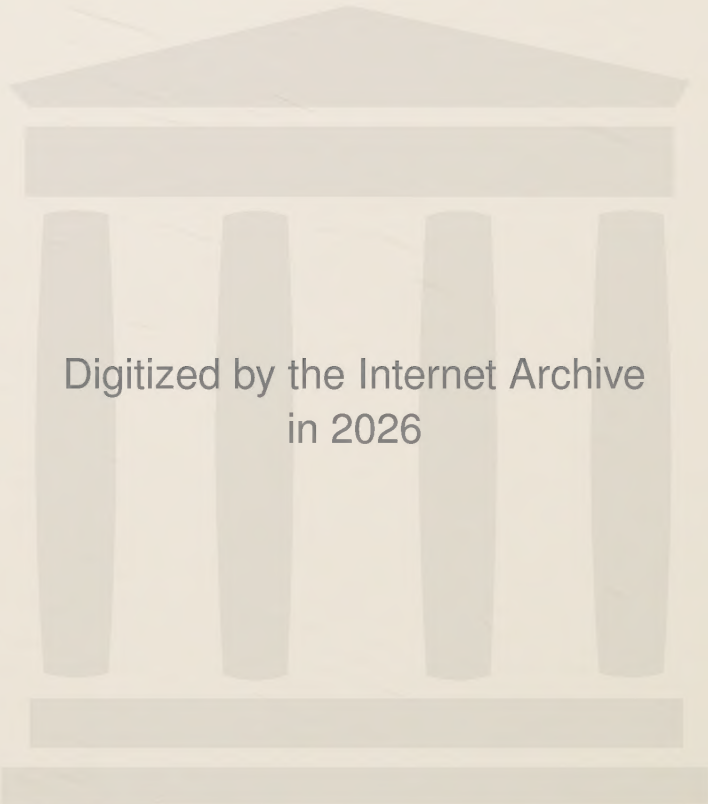
par

Françoise SIMMLER

de La Chaux-de-Fonds (NE)

Thèse N° 1923

Zurich
Juris Druck + Verlag AG
1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DOSAGE DU ZINC DANS LE SERUM PAR DILUTION ISOTOPIQUE SUBSTOECHIOMETRIQUE

Thèse

présentée à la faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Françoise SIMMLER

de La Chaux-de-Fonds (NE)

Thèse N° 1923

Zurich
Juris Druck + Verlag AG
1979

La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs W. Haerdi, professeur ordinaire et directeur de thèse, W. Rüedi, professeur associé (Dpt de chimie minérale et analytique – Genève) et M. Roth, directeur ès sciences (Directeur du Laboratoire central de l'Hôpital cantonal – Genève) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 13 juillet 1979

Le doyen:
Bernard Levrat

Thèse N° 1923



ISBN 3 260 04691 7

A ma famille

Ce travail a été effectué au cours des années 1976 - 1979
au laboratoire central de l'hôpital cantonal de Lucerne.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance
à MM. les professeurs W. Haerdi et W.F. Rüedi
pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail
et pour leurs précieux conseils.

Je remercie très vivement mes chefs MM. les professeurs
B. Truniger et F. Nager, ainsi que les autorités de
l'hôpital cantonal de Lucerne, de m'avoir accordé la
possibilité d'exécuter ce travail.

De même, je suis obligée à MM. S. Dogan et K. Gautschi
pour la détermination de valeurs de référence ;
à M. Glanzmann aussi bien qu'à MM. Blanc et R. Weber
de Technicon Genève qui m'ont aidée à surmonter les
malices de l'AutoAnalyzer ; à M. Blättler pour les
photos ; et, last but not least, à M. Jean Wälti qui
a corrigé mes manuscrits et donné un peu de souplesse
à mon "français fédéral".

TABLEAU DES MATIERES

PARTIE THEORIQUE

1. Le zinc dans l'organisme.

1.1. Introduction	1
1.2. La répartition du zinc dans l'organisme humain	1
1.3. Le métabolisme du zinc	2
1.4. Carence et toxicité	4
1.5. Quelques fonctions biochimiques du zinc	7
1.6. La forme chimique du zinc dans le sang	10
1.7. Les valeurs normales du zinc dans le sérum, le plasma et les érythrocytes.	12
1.8. Le zinc dans différentes conditions patho- logiques et dans la grossesse	16
1.9. Les méthodes d'analyse du zinc sanguin	18
1.10. Applications diagnostiques du dosage du zinc sérique	19

2. Le dosage du zinc par dilution isotopique substoéchiométrique.

2.1. La dilution isotopique substoéchiométrique . .	20
2.2. "Concentration dependent method"	22
2.3. Théorie de l'extraction au solvant	23
2.4. L'extraction du zinc avec la dithizone	26
2.5. Le dosage substoéchiométrique de zinc	28

PARTIE EXPERIMENTALE

3. Dosage du zinc dans des solutions aqueuses pures.	
3.1. Méthodes et matériaux	33
3.2. Mise au point de la méthode et essais préliminaires	38
3.3. Evaluation de la méthode	42
4. Dosage du zinc dans le sérum.	
4.1. Problèmes du dosage dans le sérum	52
4.2. Mise au point de la méthode	54
4.3. Evaluation de la méthode	65
5. Automatisation.	
5.1. Introduction	69
5.2. Matériaux et méthodes	70
5.3. Extraction de solutions aqueuses de zinc . . .	85
5.4. Essais avec du sérum	105
6. Conclusions générales	110

LISTE DES SYMBOLES ET ABBREVIATIONS

AA absorption atomique

a activité mesurée (impulsions ou counts par minute)

β_s constante cumulative de stabilité du complexe MB_s

$$= \frac{[MB_s]}{[M^{+n}][B]^s}$$

c_{HA} concentration initiale de la substance HA

$[HA]$ concentration d'équilibre de la substance HA

CV coefficient de variation = $100 s / \bar{x}$

EC capture électronique

HDz dithizone

ipm impulsions par minute (synonyme : cpm, counts par min.)

keV kiloélectronvolt

K_{ab}^{HA} constante acide-base de la substance HA = $[H^+][A^-] / [HA]$

K_D^M coefficient de distribution de la substance M

$$= \frac{[M] \text{ sous toutes formes dans la phase organique}}{[M] \text{ sous toutes formes dans la phase aqueuse}}$$

K_P^{HA} coefficient de partage de la substance HA

$$= \frac{[HA]_{org.}}{[HA]_{aqu.}}$$

K_e constante d'extraction de la réaction $n HA + M^{+n} \rightleftharpoons MA_n + nH^+$

$$= \frac{[MA_n]_{org} [H^+]^n}{[HA]_{org}^n [M^{+n}]}$$

λ longueur d'ondes (nm)

m quantité séparée

MeV mégaélectronvolt

n charge de l'ion métallique, ou nombre d'essais
simultanés

S activité spécifique = a/m

s écart type

T_x temps de mesure

u.d.a. unités d'absorbance

V, V_{org} volumes de la phase aqueuse et organique respectivement

$\bar{x}$ moyenne d'une série de valeurs.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE 1

LE ZINC DANS L'ORGANISME

1.1. Introduction

La découverte du rôle biologique du zinc remonte au 19.^{siècle}. En 1869, Raulin reconnut que le zinc est indispensable à la croissance de la moisissure *Aspergillus niger*. En 1934, Todd démontra que le zinc est essentiel pour le rat. En 1940, Keilin et Mann^(K5) décelèrent le premier métalloenzyme qui contient du zinc : l'anhydrase carbonique. Dès lors, on en a trouvé de nombreux autres. En 1963, Prasad et ses collaborateurs^(P11) décrivirent pour la première fois des symptômes de carence de zinc chez l'homme. Ces dernières années, au fur et à mesure que les méthodes de dosage du zinc sont devenues plus précises et plus sensibles, on a découvert un nombre croissant de processus dans lesquels le zinc joue un rôle décisif. Nous allons résumer quelques aspects du rôle biologique du zinc.

1.2. La répartition du zinc dans l'organisme humain.

Le corps d'une personne adulte contient environ 2 à 4 g de zinc. On en a trouvé dans tous les organes et tissus, mais dans des concentrations différentes (tableau 1).

Les teneurs maximum se trouvent dans la prostate, les reins, le foie et les muscles. Quelques tissus de l'oeil, soit la rétina et le tapetum lucidum des carnivores, sont également

très riches en zinc. On estime que l'épiderme contient environ 20 % du zinc de l'organisme humain^(M3,U1). Dans les cheveux, qui sont le reflet de la teneur en métaux essentiels et toxiques du corps humain, on a trouvé une moyenne de 180 ppm environ pour les hommes et de 200 ppm pour les femmes^(H10). Le sang humain en contient 6 à 7 ppm ; il fera l'objet d'une discussion plus détaillée.

Tableau 1

Teneur en zinc de quelques organes et tissus humains
(en μg par g de tissu frais) (T3)

épinéphron	12 ppm
cerveau	14 ppm
cœur	33 ppm
reins	55 ppm
foie	55 ppm
poumons	15 ppm
muscles	54 ppm
pancréas	29 ppm
prostate	102 ppm
testicules	17 ppm

1.3. Le métabolisme du zinc

Ingestion et excrétion (H3,H10,D1,B12,M3,U1,W2)

Dans nos pays, la quantité moyenne de zinc ingérée avec la nourriture se monte à 10 à 15 mg par jour. Des essais de bilan ont montré que 0.5 à 1 mg de zinc sont résorbés par jour, probablement dans le duodénum. Les reins éliminent quotidiennement une quantité analogue, soit 0.5 mg environ. La plus grande partie du zinc de la nourriture est excrétée

avec les selles. Dans un climat chaud, plusieurs milligrammes par jour peuvent être perdus avec la sueur.

L'absorption du zinc peut être influencée par d'autres métaux et composants de la nourriture. Il semble que le mécanisme d'absorption est le même pour le zinc, le fer, le cobalt et le manganèse; un excès d'un de ces métaux peut supprimer l'absorption des autres^(D1). Il existe aussi un antagonisme entre le zinc et le cuivre, soit au niveau de l'absorption intestinale, soit ailleurs. Par l'expérimentation animale, on a pu démontrer qu'une dose excessive de calcium peut aggraver les symptômes de carence en zinc. En présence de calcium et d'acide phythique en concentrations élevées, le zinc passe dans une forme particulièrement insoluble.

Une surabondance de zinc dans la nourriture semble être simplement éliminée par les selles. Il faut décupler la dose normale pour observer un changement dans la concentration sanguine et dans l'élimination par voie urinaire^(D1).

Dans les régions industrialisées, la quantité inhalée avec l'air peut être considérable : jusqu'à environ 800 µg par jour selon Holtmeier^(H10). A peu près 75 % du zinc inhalé seraient retenus dans les poumons.

Etude de la distribution du zinc par marquage radioactif.

Les études de Spencer et al.^(S6) sur le métabolisme de $^{65}\text{ZnCl}_2$, injecté par voie intraveineuse, ont montré que l'activité est retrouvée surtout dans le foie, les reins et la rate, et en moindre quantité dans le pancréas, la prostate et la thyroïde. Le ^{65}Zn disparaît rapidement du plasma, mais il

séjourne longtemps dans le sang total, ce qui pourrait s'expliquer par un échange avec le zinc de l'anhydrase carbonique. Le zinc radioactif est excrété surtout avec les selles. La courbe d'élimination de l'activité totale se compose de deux branches : une partie est excrétée rapidement correspondant à une période de 12 jours environ, tandis que le reste disparaît lentement, correspondant à une période de 320 jours.

1.4. Carence et toxicité

Carence chez l'animal

Chez les animaux, on connaît depuis longtemps des maladies de carence en zinc. La parakératose des porcs, une maladie qui se manifeste par une cornification de la peau et un développement ralenti, est due à un manque de zinc dans la nourriture. De nombreuses études ont été faites sur la carence en zinc chez le rat, les poules, les porcs, les moutons, les boeufs et chez d'autres animaux. On trouve parmi les symptômes : un ralentissement général du développement, des malformations des os, des organes sexuels et de la peau, une fertilité diminuée chez les mâles et les femelles, ainsi que de graves malformations ou la mort des fœtus. Le zinc semble jouer un rôle cardinal dans la reproduction (D1,U1).

Carence chez l'homme

En 1963, A.S. Prasad et al.^(P11) étudiaient un groupe de jeunes hommes en Egypte. Ces patients souffraient d'une anémie de carence de fer, d'hépatosplénomégalie, de nanisme, d'atrophie des organes sexuels et de lésions de la peau.

Prasad supposait qu'une carence de fer ne pouvait être la seule raison de ces troubles, et il constatait par la suite que la concentration en zinc du plasma, des érythrocytes, des cheveux et des urines de ces nains était plus basse que chez les personnes normales. Tandis que le métabolisme de ^{65}Zn injecté était accéléré, l'activité de la phosphatase alcaline, d'une enzyme contenant du zinc, était diminuée. Prasad et son groupe en concluent qu'ils avaient trouvé pour la première fois des cas de carence en zinc chez l'homme. De plus, les patients souffraient de parasitisation et se nourrissaient presque exclusivement de farine de froment et de légumineuses. Leur nourriture n'était pas spécialement pauvre en zinc, mais elle contenait dix fois plus de phythate, qui forme des composés peu solubles avec le zinc. Plus tard, d'autres patients présentant les mêmes symptômes étaient découverts en Iran. Ils purent être guéris par un traitement au zinc.

Une perte ou une réduction de l'odorat peut aussi être un signe d'une carence en zinc, de même qu'une cicatrisation ralentie des plaies.

Normalement, dans nos pays, une carence en zinc n'est pas à craindre. Les aliments les plus riches en zinc sont la viande, les oeufs et les céréales^(H10). Pourtant, un certain danger de manque en zinc existe à long terme : pour certaines personnes soumises par exemple à une diète monotone, pour des populations pauvres, ainsi que pour des patients hospitalisés, des bébés et des femmes enceintes^(H10). Il en va de même pour des personnes qui perdent ou éliminent plus de zinc que la normale, comme

c'est le cas pour des grands brûlés, des opérés ou des patients traités avec des ligands chélatants (pénicillamine), les alcooliques ou pour des personnes transpirant beaucoup^(S10). Les personnes hémodialysées semblent aussi être des candidats à une carence de zinc^(A3,M6).

On connaît depuis longtemps une maladie héréditaire rare, l'acrodermatite entéropathique. Elle se manifeste chez les nourrissons par des éruptions de la peau (notamment aux extrémités et autour des orifices), par des diarrhées et par une alopecie. S'ils ne sont pas traités, ces enfants dépérissent lentement : tout leur développement physique et mental est retardé, les yeux sont parfois affectés aussi, et ils deviennent très sensibles aux infections ; ils meurent le plus souvent au jeune âge. De quelques cas de femmes ayant pu atteindre l'âge de la maturité on a pu observer qu'elles ont eu de fausses couches ou mis au monde des bébés malformés. Pendant longtemps, on a complètement ignoré la cause de cette maladie. Les patients étaient traités à la diiodohydroxyquinoline, avec plus ou moins de succès. Ce n'est qu'en 1973 qu'on en découvrit l'origine. En effet, les pédiatres anglais Moynahan et Barnes^(M4,M5) tentèrent d'ajouter du zinc à l'alimentation d'une fillette atteinte d'acrodermatite entéropathique. Les symptômes disparurent si rapidement et complètement, que l'idée leur est venue que la raison fondamentale de cette maladie pouvait être une carence en zinc. Cette hypothèse fut confirmée par la suite, et aujourd'hui il est prouvé que l'acrodermatite entéropathique est due à une grave carence en zinc, causée par une

diminution de son absorption par voie intestinale^(B9,M5,N1). Elle se transmet héréditairement. Avec quelques dizaines de milligrammes de ZnSO_4 par jour, ces malades peuvent mener une vie normale.

Toxicité du zinc^(H10)

Le zinc est relativement peu toxique. On peut s'imaginer une intoxication au zinc

- par ingestion de composés du zinc
- par diffusion à travers la peau blessée ou intacte
- par inhalation de vapeurs de ZnO .

Par ingestion orale, la dose létale pour l'homme est de 5 g de ZnSO_4 ou de 10 g de ZnCl_2 environ. Des quantités plus petites causeraient des vomissements et des diarrhées sans laisser de lésions permanentes. Des intoxications par l'application de pommades au zinc sur la peau blessée ne semblent pas être connues. L'intoxication la plus dangereuse est l'inhalation de vapeurs de ZnO ; elle peut se produire accidentellement (intoxication industrielle). Elle cause des fièvres, des nausées, des dépressions et une augmentation temporaire des leucocytes^(H10).

1.5. Quelques fonctions biochimiques du zinc.

Le zinc et les enzymes ^(B6,D3,H10,M3,R2,S1,V1 - V4,W2)

Le zinc est le cofacteur d'un grand nombre d'enzymes. Actuellement, on connaît environ 80 enzymes contenant du zinc, dont la plupart sont des hydrolases et des lyases (tableau 2). Le zinc peut faire partie du centre catalytique de l'enzyme, il peut former une liaison entre le substrat et l'enzyme, ou il peut

Tableau 2

Exemples d'enzymes contenant du zinc (V3,86)

Enzyme (source)	P.mol.	at.Zn/mol
déshydrogénase d'alcool (levure)	150'000	4
déshydrogénase d'alcool (cheval)	80'000	4
déshydrogénase de malate (boeuf)	40'000	1
déshydrogénase de glutamate (boeuf)	1000'000	2 à 6
polymérase de ARN (E.coli)		
polymérase de ADN (E.coli)	109'000	2
phosphatase alcaline (E.coli)	89'000	4
carboxypeptidase A (boeuf)	34'000	1
anhydrase carbonique (humain)	28'000	1
dipeptidase (porc)	47'000	1
aminopeptidase de leucine	300'000	4 à 6

servir à maintenir sa structure secondaire. La carboxypeptidase par exemple, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acide aminé C-terminal d'une polypeptide, contient du zinc dans son centre catalytique^(L6): (fig.1)

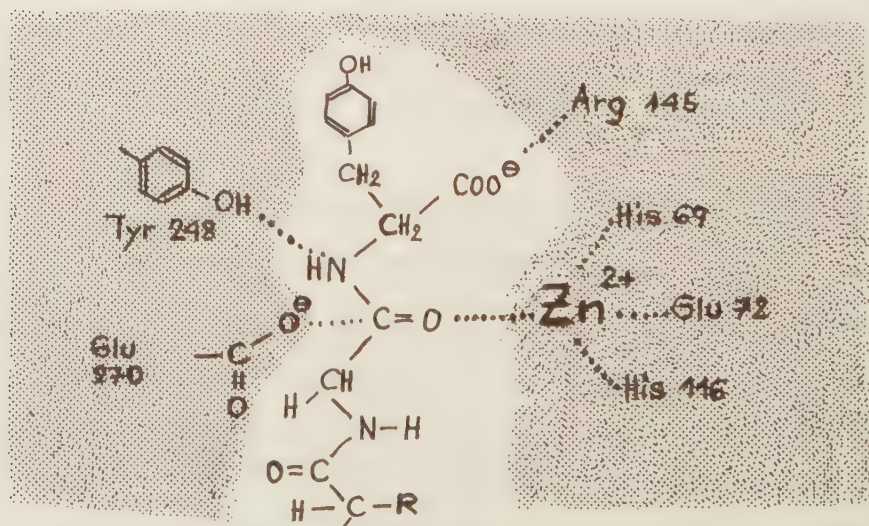


fig. 1 : centre catalytique de la carboxypeptidase

Dans certaines enzymes, les ions Zn^{2+} peuvent être remplacés par d'autres métaux comme le Fe^{2+} , le Co^{2+} ou le Mn^{2+} , sans que l'activité enzymatique se perde^(S1,R2). Par exemple, deux des quatre ions Zn^{2+} de la déshydrogénase d'alcool des mammifères font partie du centre catalytique, les autres non. Si les deux Zn^{2+} "non-catalytiques" sont échangés contre deux Co^{2+} , l'activité enzymatique ne change pas ; si tous les quatre Zn^{2+} sont remplacés par Co^{2+} , il reste une activité de 64 %^(S1). Dans la carence en zinc chez l'animal et chez l'homme, on a trouvé des activités diminuées de la déshydrogénase d'alcool et de la phosphatase alcaline^(P11,U1).

Le zinc et l'insuline

L'insuline est biosynthétisée dans les cellules β des îles de Langerhans situées dans le pancréas. On a montré que ces cellules sont riches en zinc. L'insuline se cristallise sous forme d'hexamères avec deux ions Zn^{2+} . Dans l'expérimentation animale, la dithizone peut engendrer un diabète sucré^(H10).

Le zinc et la division cellulaire.^(R2,V4)

On a étudié les conséquences d'une carence en zinc chez l'algue unicellulaire *Euglena gracilis*. Toutes les phases de la division cellulaire sont dérégées chez les algues privées de zinc. Les polymérases de ADN et ARN d'*Euglena gracilis* comme celles d'autres unicellulaires ont été reconnues comme des enzymes contenant du zinc. Pourtant, il n'est pas clair quels sont les processus enzymatiques qui limitent la croissance des algues en absence de zinc, puisque dans beaucoup d'enzymes le zinc peut être remplacé par d'autres ions métalliques.

Le zinc et la vitamine A

Smith et al.⁽⁸⁹⁾ rapportent que des animaux privés de zinc ont des concentrations plasmatiques diminuées en vitamine A ainsi qu'en sa protéine de transport RBP (retinol binding protein). Toutefois, le stock de la vitamine A dans le foie reste normal. Ils émettent l'hypothèse que le zinc est nécessaire dans la synthèse de RBP. Après ingestion de zinc, le taux plasmatique de la vitamine A redeviendrait normal.

1.6. La forme chimique du zinc dans le sang

Le sang humain total contient à peu près 6 à 7 μg de zinc par ml. La majeure partie du métal est contenue dans les érythrocytes ; environ 15 μg par ml d'érythrocytes, soit environ 90 % du zinc sanguin. Les leucocytes contribuent à raison d'environ 3 % au zinc sanguin ; un seul leucocyte contient 25 fois plus de zinc qu'un érythrocyte^(V2). Environ 0.07 μg par ml de sang total sont contenus dans les plaquettes^(F1). Lors de la coagulation, le zinc des plaquettes est mis en liberté ; c'est pourquoi on trouve des valeurs un peu plus élevées pour le sérum que pour le plasma. Le sérum et le plasma contiennent environ 1 μg de zinc par ml.

Dans les érythrocytes, la majorité du zinc semble être contenue dans l'anhydrase carbonique^(V2).

Dans le plasma et le sérum, le zinc est lié à des protéines. Le zinc enzymatique ne représente qu'une faible fraction. La majeure partie du zinc est considérée comme "zinc de transport". Une protéine spécifique pour le transport du zinc n'a pas été

découverte jusqu'à aujourd'hui. Plusieurs spécialistes sont d'accord que les protéines de transport les plus importantes sont l'albumine et l' α_2 -macroglobuline. Parisi et Vallee^(P1) ont séparé les protéines du sérum humain par échange ionique et par filtration sur gel : ils ont trouvé que le 60 à 70 % du zinc est lié "faiblement" à l'albumine, tandis que le 30 à 40 % "plus solidement" à l' α_2 -macroglobuline. D'après Giroux^(G3) et Schechter^(S2), l'albumine porte environ 80 % du zinc sérique et l' α_2 -macroglobuline 20 %. Ils ont séparé l' α_2 -macroglobuline par précipitation au polyéthylèneglycol. Burns and Fell^(B13), avec la même technique, ont déterminé 60 % du zinc dans l'albumine, 30 % dans l' α_2 -macroglobuline et 10 % de zinc dialysable, donc de faible poids moléculaire. Malgré cette unité de doctrine, on sait peu sur la nature exacte de la liaison protéique du zinc. On est d'accord que le zinc forme des complexes avec les chaînes latérales des aminoacides^(V3). Le fait qu'on peut séparer le zinc avec des complexants ou par acidification, confirme cet avis. Des calculs au moyen de modèles^(W5) sur les complexes du zinc avec les aminoacides libres du sérum ont montré que les principaux espèces sont $\text{Zn}(\text{CysH})^{2-}$, $\text{Zn}(\text{His})^+$, $\text{Zn}(\text{His})(\text{CysH})^-$ et $\text{Zn}(\text{His})(\text{Gly})$. Giroux et Henkin^(G2) ont trouvé des résultats semblables. Environ 1 % du zinc sérique serait lié aux aminoacides libres. Selon un travail paru en 1952^(G5), les groupes imidazole des histidines seraient responsables pour la liaison du zinc in vitro. D'autres auteurs^(P8) qu'in vitro le zinc est lié aux groupes carboxyliques et -SH. La séquence complète des aminoacides de l'albumine humaine est connue

depuis 1975. La molécule se compose de 585 aminoacides, dont 35 sont des cystéines, 16 sont des histidines, 62 sont des acides glutamiques et 37 des acides aspartiques^(R4).

1.7. Les valeurs normales du zinc dans le sérum, le plasma et les érythrocytes.

De nombreuses valeurs normales ont été publiées dans les années récentes. Nous avons choisi quelques exemples (tableaux 3 et 4).

Interprétation des valeurs normales du zinc sérique et plasmatique.

Type de distribution

Presque tous les auteurs ont présumé une distribution normale (Gaussienne). Kahn^(K3) a trouvé que ses résultats s'adaptait mieux à une distribution normale logarithmique.

Différences sérum-plasma

Foley et al^(F1) ont comparé la concentration du zinc dans 14 échantillons de plasma et de sérum provenant des mêmes personnes. Ils ont trouvé en moyenne 16 % de plus dans le sérum ; ils attribuent la différence à la libération du zinc des plaquettes, à une diminution du volume et à une légère hémolyse qui accompagne souvent la coagulation. - Chez des personnes hospitalisées, Sarmini^(S12) a mesuré dans 143 échantillons de sérum une moyenne de 90 $\mu\text{g Zn}/100 \text{ ml}$ et dans 109 plasmas une moyenne de 72 $\mu\text{g Zn}/100 \text{ ml}$.

Tableau 3 : valeurs normales du zinc sérique et plasmatique

auteur, réf.	$\mu\text{g Zn}/100 \text{ ml}$ $\bar{x} \pm s$	mat.	N, sexe	méth.
Davies (H10)	95 ± 13	P	36 m.	AA
	96 ± 10.5	P	31 f.	
Foley (F1)	97 ± 14.3	P	14	AA
	115 ± 21	S	14	
Halstead (H2)	96 ± 13	P	62 m.	AA
	97 ± 11	P	27 f.	
	89 ± 13	P	26 enf.	
Hellwege (H6)	112	S	93 enf.	PH
Holtmeier (H10)	116 ± 34	S	60 m.	AA
	109 ± 15	S	60 f.	
	106 ± 18	S	78 f.	
Kahn (K3)	$\log \bar{x} = 1.95$	S	32 m.	PH
	$\log s = 0.075$		32 f.	
Kasperek (K4)	116 ± 14.5	S	184	AN
Klevay (H10)	95	P	118 m.	AA
	76	P	172 f.	
Lindeman (L8)	96	P	204 m.	AA
	88	P	54 f.	
McBean (M12)	107 ± 14	S	10 m.	AA
	95 ± 15	S	10 f.	
Prasad (P12)	104 ± 14	P	14	AA
	103 ± 9	P	14	PH
Sarmini (S12)	110 ± 12	S	42	AA

matériel (mat) : S = sérum P = plasma

méthodes (méth) : AA = absorption atomique

AN = activation neutronique

PH = photométrie à la dithizone

Tableau 4 : valeurs normales du zinc érythrocytaire

auteur, réf.	$\bar{x} \pm s$	N, sexe	méth.
Lindeman (L8)	15.7 $\mu\text{g Zn/ml}$	204 m.	AA
	15.8 $\mu\text{g Zn/ml}$	54 f.	
Prasad (P12)	14.0 $\pm$ 1.5 $\mu\text{g Zn/ml}$	14	AA
Zak (Z1)	39.6 $\pm$ 6.8 $\mu\text{g Zn/g Hb}$	20	AA
Rosner	12.0 $\pm$ 2 $\mu\text{g Zn}/10^{10} \text{ Ec}$	23	AA

Différences selon le sexe

Sur ce point, les auteurs se contredisent. Lindeman^(L8) et Klevay^(H10) trouvent une différence significative du taux sérique du zinc ; par contre, Davies^(H10), Holtmeier^(H10) et Halstead^(H2) n'en trouvent pas.

Différences selon l'âge

Là encore, il y a des contradictions. Lindeman^(L8) ainsi que Kasperek^(K4) ont observé une relation entre l'âge et le taux du zinc. Lindeman a trouvé une diminution avec l'âge chez les hommes aussi bien que chez les femmes. Kasperek mesure un taux sérique maximum chez les personnes de 30 à 40 ans. - D'après les études soigneuses de Holtmeier^(H10) sur 78 femmes normales et 174 femmes enceintes, les différences entre les groupes d'âge ne sont pas significatives. - Chez les enfants, Hellwege^(H6) trouve une concentration de zinc constante pour les nouveau-nés et ceci jusqu'à l'âge de 12 ans.

Rythme circadien

Hellwege^(H5) a constaté chez 14 enfants des variations du zinc sérique de 30 % pendant la journée. Les taux moyens étaient de 129 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ à 08^h, de 111 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ à 12^h et de 100 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ à 18^h. - Dawson^(D2) a trouvé dans le plasma de 20 personnes une moyenne de 97 $\mu\text{g Zn}/100 \text{ ml}$ à 09^h et de 82 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ à 14^h. Lifschitz^(L7) a étudié le taux sérique de 10 volontaires pendant plusieurs jours : selon lui, le zinc sérique varie d'environ 15 % en 24 heures, avec un maximum vers 10^h et un minimum vers 06^h.

Autres facteurs influençant la concentration du zinc.

Kasperek^(K4) a découvert qu'après un repas le taux du zinc sérique est abaissé de presque 30 % durant plusieurs heures. Persigehl^(P9) a étudié le comportement du zinc et des protéines sériques dans plusieurs situations : après un effort physique, le taux du zinc est plus élevé qu'après une période de repos ; cette différence reflète simplement la variation du taux des protéines sériques due à un écoulement d'eau intravasale. Une ingestion ou une infusion de glucose diminuent simultanément le taux des protéines et celui du zinc. Après un repas constitué essentiellement de protéines, seul le zinc est diminué.

Conclusions pour l'analyse du zinc dans le sérum ou le plasma

Si on veut obtenir des résultats valables, on doit donc standardiser les conditions de prélèvement de l'échantillon :

- tous les échantillons doivent être prélevés si possible à la même heure;
- le patient devrait être à jeun;
- il serait souhaitable que le patient soit étendu pendant un quart d'heure avant la prise de l'échantillon;
- on ne peut pas comparer le sérum et le plasma ; puisque les valeurs sont altérées un peu par la coagulation, le plasma nous semble préférable;
- il faut éviter toute hémolyse, étant donné que les érythrocytes contiennent 15 fois plus de zinc que le plasma. On pourrait détecter une hémolyse par la détermination du potassium, d'enzymes comme la LDH, la GOT ou la phosphatase alcaline, ou encore de l'hémoglobine avec une méthode sensible;
- il va de soi qu'il faut contrôler tout le matériel afin d'éviter toute contamination en zinc.

1.8. Le zinc dans différentes conditions pathologiques et lors d'une grossesse.

Dans le tableau 5, nous avons réuni quelques états pathologiques pour lesquels le métabolisme du zinc est changé.

Carence de zinc

Une carence aiguë en zinc diminue la concentration plasmatique. Un manque de zinc à long terme se manifeste par une

Tableau 5:

Concentrations du zinc dans différents états pathologiques

concentration : ↑ = élevée ↓ = diminuée N = normale

état	taux de zinc	réf.
cirrhose du foie	plasma ↓, urines ↑	H2, R5
diabète sucré	plasma N, urines ↑	H10
artériosclérose	plasma ↓	H10
tuberculose	plasma ↓	H2
cancer du poumon	plasma ↓	M3
infarctus du myocarde	plasma ↓	H2
porphyrie intermittente aiguë	plasma ↑, urines ↑ ?	R3
infection bactérielle	plasma ↓	W2
anémie pernicieuse	plasma ↓	M3
anémie drépanocytaire	plasma ↓, urines ↑, érythrocytes ↓	B9
différentes leucémies	plasma ↓, leucocytes ↓	M3
maladie de Hodgkin	plasma ↓, érythrocytes ↓	M3

diminution du taux du zinc dans les érythrocytes ainsi que dans les cheveux.

Le zinc lors d'une grossesse et sous l'influence d'oestrogènes.

Holtmeier et al.^(H10) ont étudié le zinc dans le sérum de 174 femmes enceintes. Ils ont constaté une diminution lente au cours de la grossesse, d'une moyenne de $92 \pm 25 \mu\text{g Zn}/100 \text{ ml}$ au 4^{ème} mois jusqu'à $73 \pm 14 \mu\text{g Zn}/100 \text{ ml}$ avant l'accouchement. La moyenne de tous les sérums était de $84.7 \pm 7.5 \mu\text{g Zn}/100 \text{ ml}$ comparé à $106 \pm 18 \mu\text{g Zn}/100 \text{ ml}$ dans 78 contrôles normaux.

Halstead^(H1, H2) et Rosner^(R5) ont aussi constaté une diminution du zinc plasmatique chez des femmes prenant des contraceptifs.

1.9. Les méthodes d'analyse du zinc sanguin

Les méthodes courantes de dosage du zinc dans la matière biologique sont la spectrophotométrie d'absorption atomique, la spectrophotométrie du complexe zinc-dithizone et l'activation neutronique.

La spectrophotométrie d'absorption atomique est aujourd'hui la méthode par excellence. Elle est simple et rapide : elle évite les dangers de contamination comme cela peut être le cas pour les autres méthodes ; le blanc des réactifs peut être compensé facilement, et une déprotéinisation n'est pas nécessaire^(G1,F1,H2,L8,H10,P12,S12).

La spectrophotométrie du complexe zinc-dithizone est de moins en moins utilisée^(H6,K2,K3). Le complexe zinc-dithizone est coloré en rouge et soluble dans le tétrachlorure de carbone.

Les protéines du sérum doivent être précipitées d'abord.

Du surnageant on extrait le zinc avec une solution de dithizone dans CCl_4 . Le dithizonate de zinc est ensuite mesuré au spectrophotomètre à 538 nm. Des réactifs masquants rendent l'extraction sélective au zinc. - Une autre technique spectrophotométrique utilise le 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol en phase aqueuse^(C1,C2).

Activation neutronique :^(K4,P9) L'échantillon est irradié dans un flux de neutrons thermiques. Il se forme les isotopes $^{69\text{m}}\text{Zn}$ ($T_{1/2} = 14 \text{ h}$), ^{69}Zn ($T_{1/2} = 58 \text{ m}$) et ^{65}Zn ($T_{1/2} = 245 \text{ j}$). Après la décroissance du $^{69\text{m}}\text{Zn}$ et d'autres isotopes à période courte, le rayonnement gamma de 1115 keV de ^{65}Zn est mesuré. Si on dispose d'un détecteur Ge(Li) et d'un ordinateur pour l'évaluation des spectres gamma, on peut mesurer le ^{65}Zn sans

séparation chimique^(K4). Cette méthode est évidemment au-dessus des possibilités d'un laboratoire d'analyses médicales ordinaires.

Dans ce travail, nous avons déterminé le zinc par la méthode de la dilution isotopique substoechiométrique. Elle sera discutée en détail dans le prochain chapitre.

1.10. Applications diagnostiques du dosage du zinc sérique.

En dépit des nombreuses maladies qui changent le taux sérique du zinc, le dosage de celui-ci n'est pas devenu une analyse de routine courante en chimie clinique. Les cas de carence en zinc, où une détermination serait indiquée, sont plutôt rares chez nous. Pour les maladies citées, d'autres phénomènes sont plus typiques et plus spécifiques de celles-ci. Selon une information du laboratoire central de l'hôpital cantonal de Zurich, le dosage du zinc sérique est effectué chez des patients présentant des difficultés lors de la cicatrisation de plaies ou de la guérison d'ulcères.

CHAPITRE 2

LE DOSAGE DU ZINC PAR DILUTION ISOTOPIQUE SUBSTOECHIMETRIQUE

2.1. La dilution isotopique substoechiométrique

2.1.1. La dilution isotopique

Cette méthode d'analyse se base sur une technique mise au point par Hevesy et Hobbie en 1932. Dans l'analyse par dilution isotopique, on mesure le changement de l'activité spécifique d'un traceur radioactif après sa dilution avec une quantité non-radioactive du même élément. Soit y la quantité du traceur et S_1 son activité spécifique ; après l'addition d'une quantité non-radioactive x , l'activité spécifique devient S_2 . S_1 et S_2 sont liées par la relation :

$$S_1 \cdot y = S_2 \cdot (x + y) \quad (1)$$

Lors d'une dilution isotopique directe, on cherche x .

Si on connaît y , et si on mesure S_1 et S_2 , x se calculera selon :

$$x = y \cdot \left(\frac{S_1 - S_2}{S_2} \right) = y \cdot \left(\frac{S_1}{S_2} - 1 \right) \quad (2)$$

Une autre possibilité permet de déterminer y par l'addition d'une quantité connue non-radioactive x (reverse isotope dilution) :

$$y = x \cdot \left(\frac{S_2}{S_1 - S_2} \right) \quad (3)$$

Dans les cas où il est impossible de mesurer S_1 , on peut ajouter, à deux échantillons y , deux différentes quantités

connues x' et x'' de l'élément, et déterminer y des activités spécifiques S'_2 et S''_2 (double dilution isotopique).

Un aperçu des diverses techniques qu'offre la dilution isotopique est donné dans les ouvrages de Ruzicka et Stary^(R11), Weiler^(W1), Alimarin^(A2) et Zimakov^(Z2).

2.1.2. Le principe de la substoechiométrie

Pour déterminer l'activité spécifique S d'un radioisotope, il faut séparer de l'échantillon une quantité connue m et mesurer son activité a , puisque $S = a/m$. Dans le cas de la dilution directe, on isole les quantités m_1 de la solution du traceur et m_2 de la solution diluée, et on mesure leurs activités respectives a_1 et a_2 . x se calcule selon la formule :

$$x = y \cdot \frac{m_2}{a_2} \left(\frac{a_1}{m_1} - \frac{a_2}{m_2} \right) \quad (4)$$

Le principe de la substoechiométrie est le suivant : on échantillonne des volumes égaux des deux solutions, en leur ajoutant des masses égales et substoechiométriques d'un réactif spécifique de séparation de l'élément à déterminer, c'est-à-dire moins qu'il ne faudrait pour séparer quantitativement la substance. Alors $m_1 = m_2 = m$, et la formule (4) se simplifie :

$$x = y \left(\frac{a_1}{a_2} - 1 \right) \quad (5)$$

L'avantage de cette technique est qu'on n'a pas besoin de connaître exactement m ; la détermination de l'activité spécifique est remplacée par la simple mesure de la radioactivité.

Une séparation substoechiométrique peut s'effectuer par extraction liquide-liquide, par précipitation ou par électrolyse ; un métal peut être séparé par échange ionique après addition d'une quantité substoechiométrique d'un ligand chélatant. Lors du dosage radioimmunologique, la substance à doser réagit avec une quantité substoechiométrique d'un anticorps spécifique.

La technique de la substoechiométrie a été développée par Suzuki et Kudo^(K7,S11), et, indépendamment, par Ruzicka et Stary^(R11).

2.2. "Concentration dependent method"^(L4): $m = f(x,y)$

Le calcul d'une quantité inconnue x avec un seul étalon y selon l'équation (5) n'est valable qu'à deux conditions :

- le blanc des réactifs doit être connu ou négligeable,
- les quantités isolées de l'étalon et de la solution diluée doivent être identiques : $m_1 = m_2 = m$.

Dans beaucoup de cas, la deuxième condition ne peut pas être remplie, m dépendant de la quantité de la substance à doser. La raison peut être due au fait que le coefficient de distribution de la méthode de séparation choisie est trop petit, ou que l'équilibre n'est pas atteint, parce que la réaction est lente, ou parce qu'on ne travaille pas dans le domaine de pH optimum (voir 2.3.).

Néanmoins, la séparation substoechiométrique peut être étendue aux analyses où m n'est pas constant. Le plus simple est de travailler avec une courbe d'étalonnage au lieu d'un seul

étalon. Si on connaît le coefficient de distribution et les paramètres du système, on peut calculer des facteurs de correction. Cette situation est discutée par Ruzicka et Stary^(R11). Des traitements mathématiques ont été développés par Landgrebe^(L4,L5) et Shamaev^(S4).

Expérimentalement, on peut déterminer si m est constant ou non, en extrayant par exemple des solutions de concentrations différentes, mais de même activité spécifique, avec une quantité substoechiométrique fixe de réactif.

2.3. Théorie de l'extraction au solvant^(R11)

Un métal M^{+n} forme avec un réactif organique HA un composé MA_n soluble dans un solvant organique :



La constante d'extraction K_e est donnée par l'équation :

$$K_e = \frac{[MA_n]_{org} \cdot [H^+]^n}{[M^{+n}] \cdot [HA]_{org}^n} \quad (6)$$

Lors d'une extraction substoechiométrique, le métal est donc en excès.

2.3.1. Domaine optimum de pH

Le rendement de l'extraction augmente avec le pH. Pour que la quantité extraite soit indépendante de la concentration du métal, une extraction substoechiométrique doit satisfaire à la condition qu'au moins le 99 % du réactif réagisse avec le métal.

Soient c_M = la concentration initiale du métal dans la phase aqueuse

c_{HA} = la concentration initiale de HA dans la phase organique

V, V_{org} = les volumes respectivement de la phase aqueuse et organique

K_p^{HA} = $\frac{[HA]_{org}}{[HA]}$ = le coefficient de partage de HA

K_{ab}^{HA} = la constante acide-base de HA

La limite inférieure est donnée par la condition que HA réagit à $\geq 99\%$: $[HA]_{org} \leq 0.01 \cdot c_{HA}$

$$pH \geq \frac{1}{n} \log \frac{c_{HA}}{n} - \frac{1}{n} \log \left(c_M - \frac{c_{HA}}{n} \frac{V_{org}}{V} \right) - \frac{1}{n} \log K_e - \log (0.01 \cdot c_{HA}) \quad (7)$$

$$pH \geq -\frac{1}{n} \log K_e - \log (0.01 \cdot c_{HA}) \quad (8)$$

La limite supérieure est fixée par la dissociation de HA dans la phase aqueuse :

$$pH \leq pK_{ab}^{HA} + \log K_p^{HA} + \log \frac{V_{org}}{V} \quad (9)$$

2.3.2. Influence de complexants dans la phase aqueuse

Souvent, on est obligé d'ajouter un complexant HB à la phase aqueuse pour éviter la précipitation d'hydroxydes, ou pour masquer d'autres métaux interférants.

Ce complexant diminue la constante d'extraction K_E :

$$K_E^* = \frac{K_E}{1 + \beta_s [B]^s} \quad (10)$$

si β_s est la constante de stabilité cumulative du complexe MB_s :

$$\beta_s = \frac{[MB_s]}{[M^{+n}] [B]^s}$$

2.3.3. Sélectivité

Quand une solution contient deux métaux M' et M'' qui forment des complexes avec HA, leur proportion dans la phase organique est :

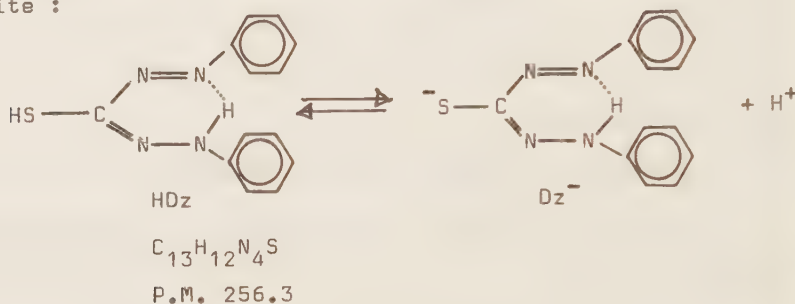
$$\begin{aligned} \frac{[M'_n A_{n'}]_{org}}{[M''_n A_{n''}]_{org}} &= \frac{K_E^I [HA]^{(n'-n'')} [M']}{K_E^{II} [H^+]^{(n'-n'')} [M'']} \\ &= \frac{K_E^I [M']}{K_E^{II} [M'']} \quad \text{si } n' = n'' \end{aligned} \quad (11)$$

Supposons que $K_E^I > K_E^{II}$. Le métal présentant la plus grande constante d'extraction est extrait préférentiellement. Une extraction substoechiométrique donne une séparation plus nette qu'une extraction avec un excès de réactif. Puisque M' est extrait pratiquement seul, sa séparation ne présente pas de difficultés. Pour extraire M'' en présence de M' , on est obligé de masquer M' , ou de séparer M' et M'' par extractions substoechiométriques successives.

2.4. L'extraction du zinc avec la dithizone

2.4.1. La dithizone (I1)

Le réactif que nous avons utilisé pour l'extraction du zinc est la dithizone (diphénylthiocarbazone), appelée HDz par la suite :



D'après Iwantscheff^(I1), la dithizone est un acide monobasique : les "dithizonates secondaires" seraient en réalité des complexes mixtes $Dz-M-OH$.

La dithizone est soluble dans le chloroforme, le tétrachlorure de carbone (0.6 g/l) et dans des solutions aqueuses alcalines. Ses solutions dans $CHCl_3$ et CCl_4 sont vertes.

Pour les solutions de dithizone dans CCl_4 , les absorbances maximum et les coefficients d'extinction millimolaires sont :

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= 620 \text{ nm}, & \epsilon_1 &= 33 \text{ l/mmol cm} \\ \lambda_2 &= 450 \text{ nm}, & \epsilon_2 &= 20 \text{ l/mmol cm} \end{aligned}$$

La constante acide-base de la dithizone est :

$$K_{ab}^{HDz} = \frac{[H^+][Dz^-]}{[HDz]} = 10^{-4.5} \quad (12)$$

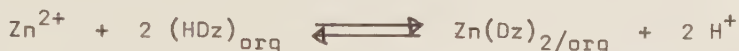
Pour le coefficient de partage $\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$ on trouve :

$$K_p^{\text{HDz}} = \frac{[\text{HDz}]_{\text{CCl}_4}}{[\text{HDz}]_{\text{H}_2\text{O}}} = 10^{4.5} \quad (13)$$

Les solutions de dithizone sont sensibles à la lumière et aux agents oxydants, surtout en solution alcaline. Selon Iwantscheff (I1), la dithizone est oxydée en diphénylcarbodiazone par des produits intermédiaires.

2.4.2. Le dithizonate de zinc (R11, I1)

Le zinc réagit avec la dithizone dans CCl_4 selon l'équation :



La constante d'extraction K_e est :

$$K_e^{\text{Zn}} = \frac{[\text{Zn}(\text{Dz})_2]_{\text{org}} [\text{H}^+]^2}{[\text{Zn}^{2+}] [\text{HDz}]_{\text{org}}^2} = 10^{2.3} = 200 \quad (14)$$

Le dithizonate de zinc est soluble dans CCl_4 ; il forme des solutions roses très stables avec $\lambda_{\text{max}} = 538 \text{ nm}$ et avec $\epsilon = 92 \text{ l/mmole cm}$.

L'extraction du dithizonate de zinc dans CCl_4 commence à partir de $\text{pH} \sim 4$; elle est complète à $\text{pH} \sim 7$. Les valeurs exactes dépendent de la concentration de la dithizone et des autres composants de la phase aqueuse. A $\text{pH} \sim 9$, la dissociation de HDz dans la phase aqueuse prévient l'extraction de $\text{Zn}(\text{Dz})_2$. Normalement, on travaillera à des pH compris entre 7 et 9.

A part le zinc, de nombreux autres métaux forment aussi des dithizonates extraibles dans CCl_4 dans un domaine de pH

comparable. Notamment les ions Ag^+ , Bi^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pd^{2+} qui ont des constantes d'extraction plus grandes que Zn^{2+} .

On est obligé de masquer ces ions pour assurer la sélectivité de l'extraction du zinc. Le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, le KCN et des dithiocarbamates comme le diéthanoldithiocarbamate et le bis(carboxyméthyl)-dithiocarbamate sont utilisés à cet effet.

2.5. Le dosage substoechiométrique du zinc (R11,S8,B2)

Nous avons dosé le zinc dans des solutions aqueuses et dans le sérum par extraction substoechiométrique à la dithizone.

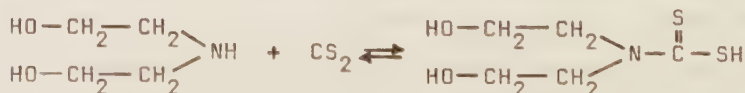
2.5.1. Réactifs et concentrations

Nous avons effectué des extractions de solutions aqueuses contenant entre 0.5 et 3 μg de Zn par ml. Le sérum contient environ 1 μg de Zn/ml.

La quantité de la dithizone a été choisie de telle manière qu'on pouvait extraire environ 80 % du zinc de la solution la plus diluée de la série. Les solutions de dithizone étaient de l'ordre de 1 à 10 μM .

Pour masquer les ions interférants, nous avons utilisé le diéthanoldithiocarbamate recommandé par Ruzicka (R11,M1).

Il est préparé par l'addition de CS_2 à la diéthanolamine :



Un pH de environ 8 a été maintenu au moyen d'un tampon $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$.

Nous pouvons calculer les limites du pH selon les équations (7) et (9), avec

$$\begin{aligned}\log K_p^{HDz} &= 4.5 \\ pK_{ab}^{HDz} &= 4.5 \\ \log K_e &= 2.3 \\ n &= 2 \\ V_{org}/V &= 1/5 \\ c_M &= 0.22 \cdot 10^{-6} M \quad (0.1 \mu g \text{ Zn dans } 7 \text{ ml } H_2O) \\ c_{HDz} &= 2 \cdot 10^{-6} M\end{aligned}$$

Sans tenir compte des complexes aqueux du zinc, nous obtenons pour la limite inférieure du pH (équation 7) :

$$\begin{aligned}pH &= \frac{1}{2} \log 10^{-6} - \frac{1}{2} \log \left(0.22 - \frac{2 \cdot 1}{2 \cdot 5} \right) \cdot 10^{-6} - \frac{1}{2} 2.3 \\ &\quad - \log (2 \cdot 10^{-8}) = \underline{\underline{7.4}}\end{aligned}$$

et pour la limite supérieure (équation 9) :

$$pH = 4.5 + 4.5 - \log 5 = \underline{\underline{8.3}}$$

2.5.2. La constante d'extraction et l'évaluation des résultats

Ruzicka et Stary^(R11) donnent une valeur de 200 pour la constante d'extraction de $Zn(Dz)_2$. Cette constante est modifiée par la présence de complexants dans la phase aqueuse selon l'équation (10).

Dans la phase aqueuse, nous avons les ligands NH_3 , Cl^- , diéthanoldithiocarbamate et probablement aussi un peu de CS_2 .

Calcul de la constante d'extraction à pH 8

Le ion Zn^{2+} forme avec l'ammoniac les quatre complexes successifs suivants : $Zn(NH_3)^{2+}$, $Zn(NH_3)_2^{2+}$, $Zn(NH_3)_3^{2+}$ et $Zn(NH_3)_4^{2+}$.

Leurs constantes de stabilité sont, d'après les tableaux de

Bjerrum, Sillen et Schwarzenbach :

$$\log K_1 = 2.32$$

$$\log K_2 = 2.29$$

$$\log K_3 = 2.36$$

$$\log K_4 = 2.39$$

$$\log \beta_2 = 4.61$$

$$\log \beta_3 = 6.97$$

$$\log \beta_4 = 9.36$$

Nous préparons une solution de NH_4Cl 0.1 M que nous ajustons au pH désiré avec une solution d'ammoniaque concentré. A pH 8, nous avons :

$$\log \frac{[NH_3]}{[NH_4^+]} = pH - pK_{ab} = 8 - 9.24 = -1.24$$

$$[NH_3] = 10^{-1.24} \cdot 0.1 = 0.00575 \text{ M}$$

Ensuite, cette solution est diluée en cours d'expérience :

$$0.00575 \frac{9.2}{10.7} = 0.00148 \text{ M} = [NH_3]$$

Selon l'équation (10),

$$\begin{aligned} K_e^* &= \frac{K_e}{1 + K_1[NH_3] + \beta_2[NH_3]^2 + \beta_3[NH_3]^3 + \beta_4[NH_3]^4} \\ &= \frac{200}{1 + 10^{2.32} \cdot 0.00148 + 10^{4.61} (0.00148)^2 + 10^{6.97} (0.00148)^3 + 10^{9.36} (0.00148)^4} \\ &= \frac{200}{1.439} = \underline{\underline{139}} \end{aligned}$$

Cette valeur n'est qu'une approximation ; elle ne tient pas compte des complexes avec Cl^- (peu stables) et avec le di-éthanoldithiocarbamate. Nous n'avons pas réussi à trouver les constantes de stabilité des complexes de ce dernier dans la littérature. Nous avons donc travaillé avec une constante d'extraction inconnue.

Si la constante d'extraction est "trop petite", l'extraction n'est plus substoechiométrique, la quantité extraite m dépendant de la quantité du métal dans la phase aqueuse^(R11).

Des mesures spectrophotométriques et radiométriques nous ont montré que la quantité extraite m augmentait en effet avec la concentration du zinc dans la phase aqueuse. Cet état de fait était très caractéristique dans la version automatisée, où le tampon masquant était moins dilué que dans la méthode manuelle.

C'est une des raisons pour lesquelles nous avons travaillé avec une courbe d'étalonnage et non avec un seul étalon comme en substoechiométrie classique.

Le deuxième argument est le "blanc". Dans la substoechiométrie, le blanc des réactifs ne peut être déterminé qu'indirectement. Nous avons jugé qu'il était plus simple et plus sûr d'établir une courbe d'étalonnage dans laquelle le blanc est compris, que d'essayer de purifier tous les réactifs jusqu'au niveau du nanogramme de zinc.

2.5.3. Le traceur

Le ^{65}Zn nous a servi de traceur. Cette radionuclide a une période de 245 jours ; elle se désintègre surtout par capture électronique (EC). La figure 2 montre son schéma de désintégration :

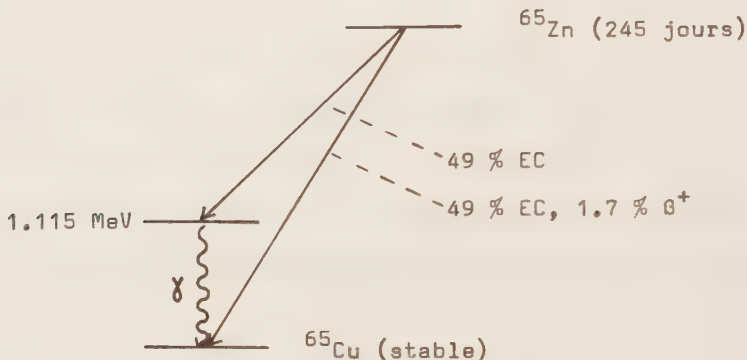
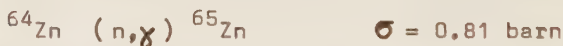


figure 2 : schéma de désintégration du ^{65}Zn

Le ^{65}Zn peut être obtenu par activation neutronique de ^{64}Zn :



Le ^{65}Zn "sans entraîneur" que nous avons utilisé est obtenu par irradiation de cuivre au cyclotron à protons :



Nous avons mesuré le rayonnement gamma de 1.115 MeV avec un compteur à scintillation NaI(Tl). La probabilité d'émission est de 0.49 photons par désintégration.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 3

DOSAGE DU ZINC DANS DES SOLUTIONS AQUEUSES PURES

3.1. Méthodes et matériaux

3.1.1. Réactifs, solutions et appareils

Réactifs utilisés :

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ Merck p.a.
- NH_4Cl Merck suprapur
- NH_3 Merck suprapur
- CS_2 Merck p.a.
- méthanol Merck p.a.
- diéthanolamine Fluka puriss.
- CCl_4 Merck no. 2208 "pour dosages à la dithizone"
- dithizone Merck p.a.
- eau désionisée provenant d'un échangeur d'ions "Ministil" (Christ)
- traceur : $^{65}\text{ZnCl}_2$ carrier-free dans HCl 0.1M ;
1 mc/ml ; activité spécifique ≥ 100 mc/mg Zn ;
(Radiochemical Center Amersham)

Solutions :

- solution stock de Zn : 1.00 mg Zn/ml dans $\text{H}_2\text{SO}_4 \sim 0.01\text{M}$
- solutions diluées de Zn : 0.5 à 5 μg Zn/ml, selon les besoins, préparées juste avant l'usage.
- tampon ammoniacal : le pH d'une solution 0.1M de NH_4Cl est ajusté à 8.2 avec de l'ammoniaque 25 %. Le tampon

est purifié par extraction avec une solution de dithizone dans CCl_4 , puis avec du CCl_4 pur.

- diéthanoldithiocarbamate : 2.3 ml (2.9 g) de CS_2 et 5 g de diéthanolamine sont dilués à 100 ml avec du méthanol.
- solution tampon-traceur : 5 ml de diéthanoldithiocarbamate et 45 ml de tampon ammoniacal sont mélangés, et on ajoute 20 à 50 μC de ^{65}Zn ; préparée juste avant l'usage.
- solution stock de dithizone environ 500 μM : 12 à 13 mg de dithizone sont dissous dans 100 ml de CCl_4 . La solution est filtrée et la concentration exacte est déterminée au spectrophotomètre Zeiss à 620 nm. Cette solution est conservée au réfrigérateur dans un ballon en quartz ; elle est stable pendant plusieurs semaines, comme des mesures répétées de la densité optique à 620 et à 538 nm l'ont montré.
- solutions d'extraction : juste avant l'usage, la solution de dithizone est diluée à 1 à 10 μM avec du CCl_4 , selon les besoins.

A part le tampon ammoniacal, ces solutions sont utilisées sans purification ultérieure.

Matériaux :

- tubes à essais avec des couvercles filetés "Sovirel", 12 ml
- pipettes à constriction 25, 50, 100 μl
- Oxford Samplers 100 μl , 1 ml
- pipettes jaugées 1 ml
- tubes de comptage en polypropylène
- cuves en verre, $l = 1 \text{ cm}$ (Zeiss)
- cuves à usage unique en polyacrylnitrile, $l = 1 \text{ cm}$ (LKB)

Appareils :

- compteur : Packard 5220, compteur à scintillation automatique avec un cristal NaJ(Tl)
- spectrophotomètres Zeiss PMQ II, plus tard DM 4
(pour des mesures en valeurs absolues)
- colorimètre à filtres LKB 7400 (pour des mesures relatives)
- pH-mètre Metrohm E 500
- secoueuse "Heidolph"
- centrifugeuse

3.1.2. Mode opératoire

1. Des solutions diluées de 1 ou 2 μg Zn/ml sont préparées.
2. Les quantités désirées de ces solutions, 50 à 150 μl , sont pipetées dans des tubes à essais avec des pipettes à constriction.
3. 2 ml du mélange tampon-traceur et 5 ml d'eau désionisée sont ajoutés.
4. Après l'addition de 1.4 ml de la solution de dithizone diluée, les tubes sont tournés pendant 15 minutes sur une secoueuse.
5. Ils sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à ~ 800 g. La phase aqueuse est aspirée.
6. Avec des pipettes jaugées, 1 ml de la phase organique est pipeté dans un tube en polypropylène.
7. Les tubes sont mesurés au compteur à scintillation.
8. Si l'on désire comparer l'extinction de la phase organique, les échantillons sont mesurés après le comptage dans le colorimètre filtre LKB 7400 à 541 nm, dans des cuves en polyacrylnitrile.

9. La verrerie est plongée dans une solution de "Deconex", ensuite dans de l'acide nitrique dilué ; puis elle est lavée à l'eau désionisée et séchée à l'étuve.

3.1.3. Mesure du ^{65}Zn

Pour la mesure du rayonnement gamma de ^{65}Zn de 1115 keV, le compteur est réglé de la façon suivante :

Gain : 1 (correspondant à 0 - 2 MeV)

Lower level : 5'00 divisions

Window : 1'60 divisions

Sample level : 2.0 cm

Nous mesurons donc avec une fenêtre de 1000 à 1320 keV.

Dans ces conditions, approximativement 5 % des désintégrations ou 10 % des photons émis sont comptés. On peut compter jusqu'à 100'000 impulsions par minutes sans pertes par coïncidence.

La figure 3 montre le spectre gamma de ^{65}Zn enregistré sur notre compteur.

3.1.4. Calcul des résultats radiochimiques

L'activité de la phase organique est inversement proportionnelle à la quantité de zinc total, comme on peut le déduire de l'équation (5). Dans la plupart des essais, nous avons choisi un nombre fixe d'impulsions, soit 10'000, 20'000 ou 40'000, et nous avons construit une courbe d'étalonnage avec le temps de mesure en fonction de la concentration du zinc. Une autre alternative consiste à calculer la droite de régression.

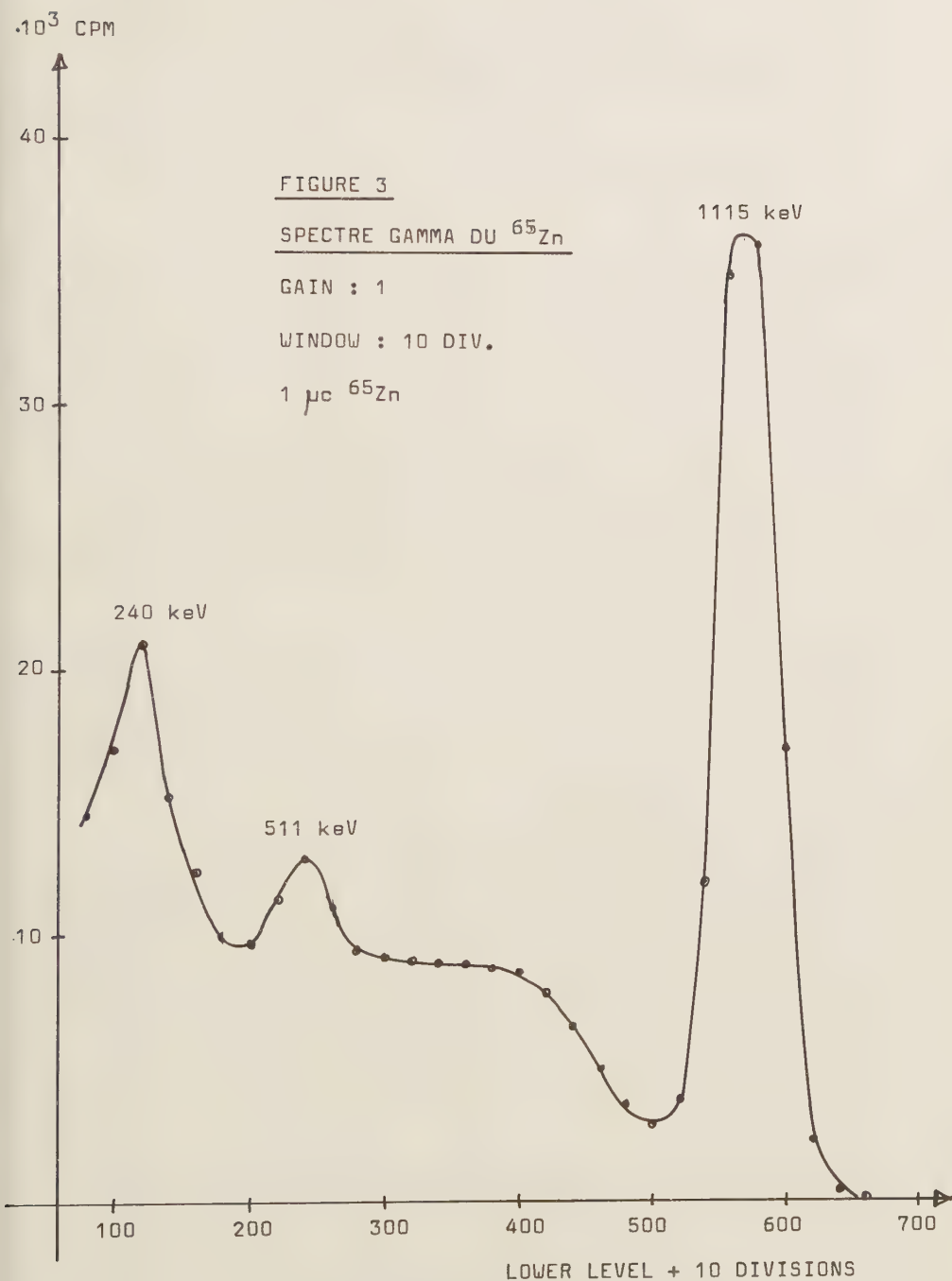
FIGURE 3

SPECTRE GAMMA DU ^{65}Zn

GAIN : 1

WINDOW : 10 DIV.

$1 \mu\text{C } ^{65}\text{Zn}$



3.2. Mise au point de la méthode et essais préliminaires

3.2.1. Influence du pH sur l'extraction (essais 40A + 40B)

Dans le chapitre 2.5.1., nous avons calculé le domaine optimum du pH : 7.4 à 8.3. Nous avons vérifié ces calculs dans les essais 40A + B.

40A : Nous avons ajusté plusieurs portions du tampon ammoniacal-diéthanoldithiocarbamate à des pH entre 7.4 et 9.8 avec HCl ou NH_3 , à l'aide d'une électrode de verre. Les solutions acides de ce système tampon ne sont pas stables. A 2 ml de ces tampons de pH différent nous avons ajouté $0.2 \mu\text{g}$ de Zn, 5 ml d'eau et 1.4 ml de dithizone environ $1 \mu\text{M}$. La densité optique des extraits organiques a été mesurée au colorimètre LKB à 541 nm. Le pH de la phase aqueuse a été remesuré après extraction.

40B : Dans cet essai nous avons utilisé un tampon phosphate 0.1M ajusté à des valeurs de pH entre 4 et 11. Le diéthanoldithiocarbamate a été omis. La dithizone était de $3 \mu\text{M}$. Les résultats sont donnés dans la figure 4.

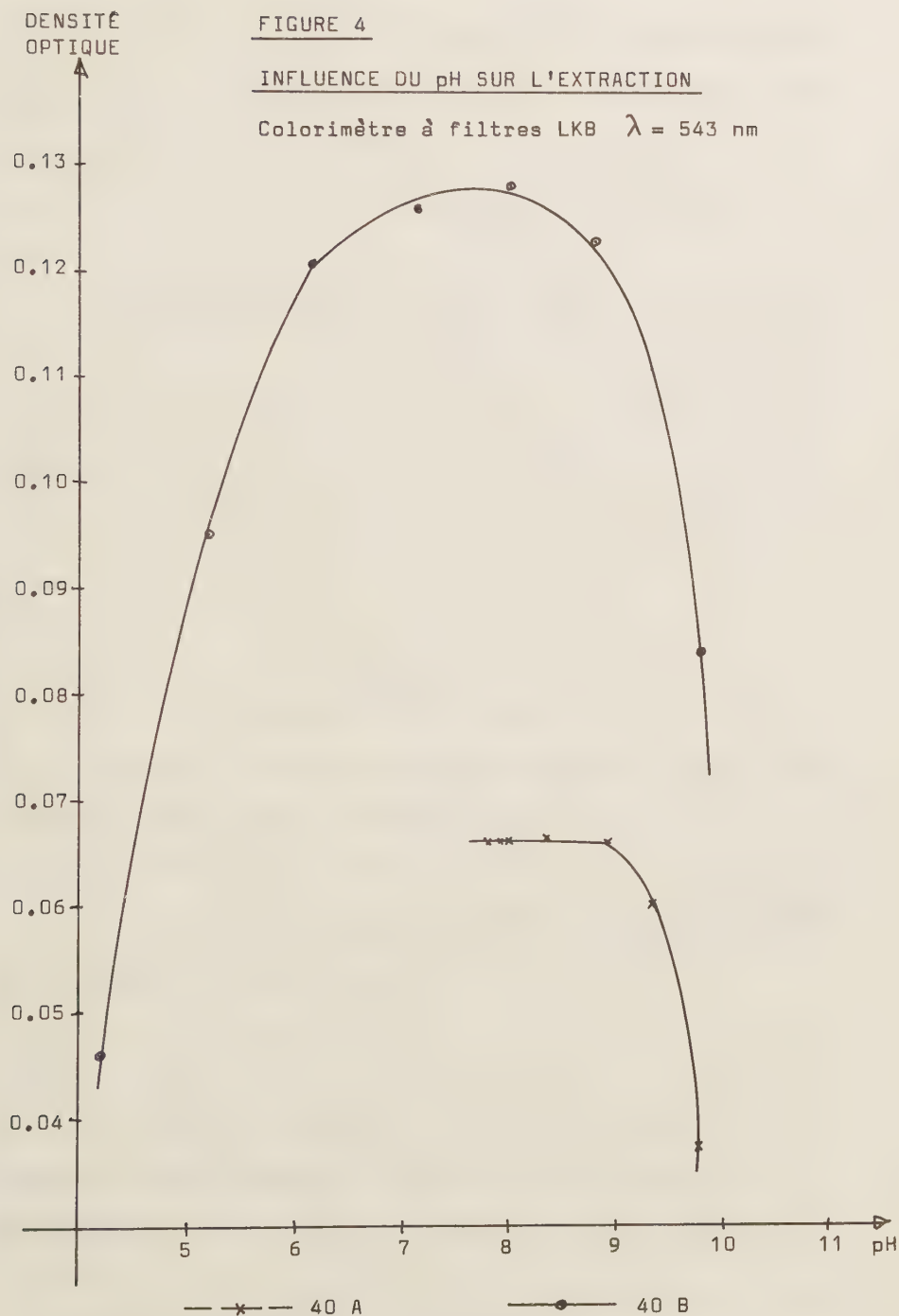
3.2.2. Influence du temps d'agitation (essai 41)

Des solutions de composition identique étaient agitées sur la secoueuse pendant 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes. La densité optique des phases était mesurée au colorimètre à filtres. Les résultats prouvent que l'équilibre est atteint après 5 minutes.

FIGURE 4

INFLUENCE DU pH SUR L'EXTRACTION

Colorimètre à filtres LKB $\lambda = 543$ nm



3.2.3. Le bilan des activités (essais 5,7)

Nous avons comparé les activités de la phase organique et de la phase aqueuse avec l'activité totale introduite dans l'essai, et nous avons vérifié que l'adsorption de ^{65}Zn sur les parois des tubes à essais est négligeable.

3.2.4. Influence de la concentration de zinc sur la quantité extraite (essais 9, 25)

Dans l'essai 9, nous avons extrait des solutions de 1, 2, 3, 4 et 5 μg de Zn avec 1.4 ml d'une solution de dithizone 20 μM . Au colorimètre à filtres LKB, nous avons trouvé les densités optiques suivantes à 541 nm :

1.0 μg Zn :	E = 0.625
2.0 μg Zn	0.648
3.0 μg Zn	0.653
4.0 μg Zn	0.656
5.0 μg Zn	0.656

Dans l'essai 25, des quantités différentes de zinc ont été extraites avec 1.4 ml de dithizone de concentration variable. Les densités optiques à 541 nm étaient : (tableau 6)

Tableau 6 : densités optiques à 541 nm

dithizone	0.5 μg Zn	1.0 μg Zn	1.5 μg Zn
9.4 μM	0.463	0.478	0.480
7.4 μM	0.384	0.392	0.395
5.6 μM	0.295	0.301	0.302
3.7 μM	0.212	0.216	0.218

La quantité extraite augmente donc légèrement avec la concentration du zinc dans la phase aqueuse. Même un grand excès de zinc n'y change rien. (1.4 ml de HDz 9.4 μM suffit pour extraire 0.43 μg de Zn). Nous avons donc la situation $m = f(x,y)$.

3.2.5. Le blanc

Puisque le zinc est un élément assez répandu, le blanc des réactifs constitue un problème important dans cette analyse. De nombreux résultats d'essais selon notre mode opératoire ont indiqué un blanc de l'ordre de $0.1 \mu\text{g}$ de Zn, probablement dans la solution stock de dithizone.

Dans l'analyse substoichiométrique, le blanc ne peut être mesuré directement ; il peut être déduit d'une courbe d'étalonnage ou déterminé par double dilution isotopique. Dans une série d'essais précédents, nous avons examiné la concordance entre les quantités de zinc introduites et les quantités retrouvées. Nous avons extrait 0.5 , 1.0 et $1.5 \mu\text{g}$ de Zn. Les échantillons avec $1.0 \mu\text{g}$ de Zn étaient pris comme étalons (y) et les teneurs (x) des autres échantillons étaient calculées selon la formule : $x = y (a_y/a_x)$ (le traceur était sans entraîneur). Systématiquement, pour les échantillons de $0.5 \mu\text{g}$ de Zn il en résultaient des valeurs trop élevées, tandis que pour les échantillons de $1.5 \mu\text{g}$ de Zn on trouvait des valeurs trop basses. Ceci s'explique par la présence d'une contamination (blanc). En considérant ces essais comme doubles dilutions isotopiques, nous avons calculé des blancs (pas très reproductibles) de 0.08 et $0.23 \mu\text{g}$ de Zn (essai 23).

Nous avons tenté d'améliorer les résultats par une extraction préalable du Zn du tampon et de l'eau, mais sans succès. Par contre, nous avons trouvé des résultats plus corrects en extrayant avec des solutions plus diluées de dithizone. Cette observation et d'autres nous ont amené à la conclusion que les

contaminations étaient dues essentiellement à la solution stock de dithizone elle-même ; soit que le produit de départ contienne des impuretés, ou que celles-ci soient extraites des parois du verre. Par la suite, nous avons conservé la solution stock de dithizone dans un ballon en quartz. En travaillant avec une courbe d'étalonnage, nous évitons ainsi de connaître exactement la valeur du blanc, ceci pour autant qu'il soit constant pour un essai et relativement peu élevé par rapport au zinc à doser.

3.3. Evaluation de la méthode

3.3.1. Précision et exactitude (essais 51 - 60)

Pour étudier la précision et l'exactitude, nous avons effectué dans dix expériences successives dix courbes d'étalonnage. Dans chaque expérience nous avons déterminé le zinc dans trois solutions aqueuses "inconnues".

Pour les courbes d'étalonnage, nous avons pris 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 et 0.30 μg Zn ; nous avons effectué des déterminations en double. Ces solutions ont été extraites avec 1.4 ml de dithizone environ 1.75 μM ; cette quantité extrait 0.08 μg de zinc.

Pour les échantillons aqueux à doser nous avons préparé trois solutions avec 60, 110 et 140 μg Zn/ml. Ces solutions ont été distribuées dans de petits tubes en polystyrène et gardées au congélateur. Pour chaque essai un échantillon de chaque solution était dilué 1 : 100 et 0.2 ml étaient analysés.

Ces solutions diluées contenaient donc :

$$P_1 : 0.6 \mu\text{g Zn/ml} = 0.12 \mu\text{g Zn/ } 0.2 \text{ ml}$$

$$P_2 : 1.1 \mu\text{g Zn/ml} = 0.22 \mu\text{g Zn/ } 0.2 \text{ ml}$$

$$P_3 : 1.4 \mu\text{g Zn/ml} = 0.28 \mu\text{g Zn/ } 0.2 \text{ ml}$$

Le tableau 7 donne la composition de ces essais.

Tableau 7

Zn = solution étalon de Zn à $2 \mu\text{g/ml}$

HDz = solution de dithizone dans CCl_4 , environ $1.75 \mu\text{M}$

T = mélange tampon-traceur

tube no.	$\mu\text{l Zn}$	$\mu\text{g Zn}$	ml T	ml H_2O	ml HDz	
1,2	50	0.10	2.0	5.0	1.4	
3,4	75	0.15	2.0	5.0	1.4	
5,6	100	0.20	2.0	5.0	1.4	
7,8	125	0.25	2.0	5.0	1.4	
9,10	150	0.30	2.0	5.0	1.4	
11,12			2.0	5.0	1.4	0.2 ml P_1
13,14			2.0	5.0	1.4	0.2 ml P_2
15,16			2.0	5.0	1.4	0.2 ml P_3

Mesure et calcul du zinc "inconnu":

1.0 ml de la phase organique a été mesuré au compteur à scintillation. Pour un nombre fixe d'impulsions (20'000), le temps de mesure T_x est inversement proportionnel à l'activité de la phase organique. Celle-ci est inversement proportionnelle à la quantité totale de zinc, comme on peut le déduire de l'équation (5). Par conséquence, T_x est linéairement proportionnel à la quantité totale de zinc. La teneur des échantillons P_1 , P_2 et P_3 a été déterminée à l'aide d'une droite de régression, dans laquelle

x_i = quantité de zinc de l'étalon

y_i = temps de mesure T_x de l'étalon

Nous citons comme exemple l'essai no. 52 (tableau 8).

Tableau 8 : résultats de l'essai no. 52

tube no.	étalon $\mu\text{g Zn}$ x	T_x min/100 y	$\mu\text{g Zn}$ trouvés
1,2	0.10	125,124	
3,4	0.15	163,165	
5,6	0.20	204,205	
7,8	0.25	246,246	
9,10	0.30	284,289	
11,12		137,137	P_1 : 0.116, 0.116
13,14		222,223	P_2 : 0.220, 0.222
15,16		267,267	P_3 : 0.276, 0.276

T_x est donné en centièmes de minutes

nombre d'impulsions : 20'000

droite de régression : $y = 812x + 42.7$

Les résultats trouvés pour les solutions P_1 , P_2 et P_3 dans les essais 51 - 60 sont réunis dans le tableau 9.

Nous trouvons pour les moyennes et les écart-types :

$$P_1 : \bar{x} \pm s = 0.1189 \pm 0.0039 \mu\text{g Zn}$$

coefficient de variation : 3.34 %

$$P_2 : \bar{x} \pm s = 0.2192 \pm 0.0048 \mu\text{g Zn}$$

coefficient de variation : 2.16 %

$$P_3 : \bar{x} \pm s = 0.2830 \pm 0.0074 \mu\text{g Zn}$$

coefficient de variation : 2.60 %

Tableau 9: Zn trouvé pour les solutions P_1 , P_2 , P_3 .

essai no.	$P_1 \mu\text{g Zn}$	$P_2 \mu\text{g Zn}$	$P_3 \mu\text{g Zn}$
51	0.114, 0.110	0.207, 0.211	0.267, 0.276
52	0.116, 0.116	0.220, 0.222	0.276, 0.276
53	0.116, 0.116	0.225, 0.225	0.288, 0.292
54	0.116, 0.119	0.226, 0.217	0.291, 0.292
55	0.123, 0.121	0.216, 0.217	0.277, 0.283
56	0.118, 0.125	0.218, 0.225	0.292, 0.291
57	0.120, 0.126	0.218, 0.220	0.275, 0.277
58	0.121	0.220, 0.221	0.291, 0.280
59	0.122, 0.118	0.220, 0.220	0.283, 0.283
60	0.121, 0.122	0.217	0.286, 0.285

Reproductibilité de la courbe d'étalonnage

Pour comparer les courbes d'étalonnage des essais 51 - 60 entre elles, nous avons divisé le temps de mesure T_x par celui des étalons avec $0.2 \mu\text{g}$ de Zn. Ce quotient $y' = T_x / T_{0.2}$ est indépendant de l'activité du mélange tampon-traceur et de la concentration exacte de la dithizone dans la phase organique.

Les valeurs de $y' = T_x / T_{0.2}$ pour les dix courbes d'étalonnage sont données dans le tableau 10.

La figure 5 montre la courbe d'étalonnage construite avec les moyennes des valeurs de y' en fonction de la quantité x de Zn :

x	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30 $\mu\text{g Zn}$
$\bar{y}'$	0.6114	0.8055	1.000	1.197	1.401
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
s	0.0148	0.0104	0.0107	0.0159	0.0240

Tableau 10: $y' = T_x / T_{0.2}$ pour les étalons x.

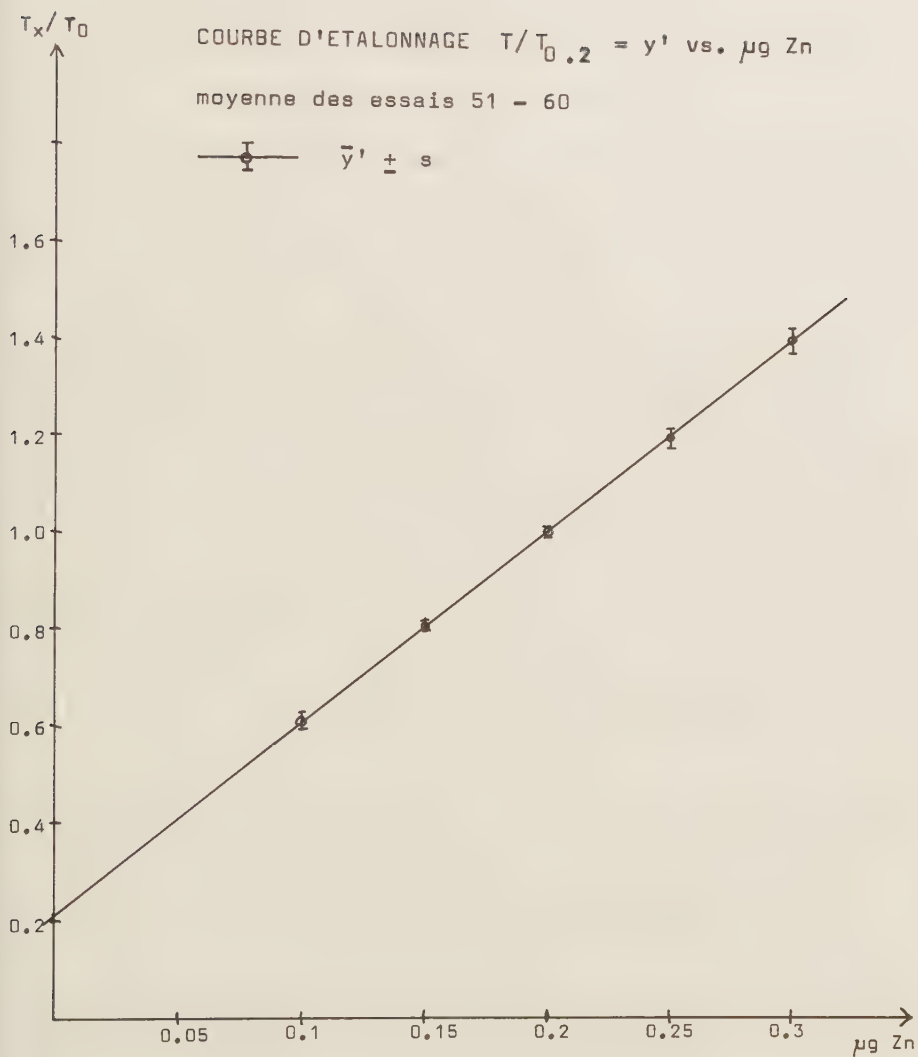
essai no.	0.10 μg	0.15 μg	0.20 μg	0.25 μg	0.30 μg Zn
51	0.596 0.596	0.817 0.784	0.986 1.014	1.183 1.188	1.404 1.380
52	0.609 0.605	0.795 0.805	0.997 1.002	1.20 1.20	1.385 1.410
53	0.624 0.615	0.80 0.80	0.998 1.002	1.181 1.220	1.409 1.404
54	0.590 0.590	0.809 0.828	0.976 1.023	1.195 1.167	1.367 1.349
55	0.640 0.610	0.793 0.814	0.997 1.002	1.196 1.196	1.425 1.450
56	0.641 0.608	0.80 0.809	1.005 0.995	1.196 1.187	1.392 1.383
57	0.610 0.605	0.810 0.805	1.009 0.990	1.220	1.410 1.434
58	0.636 0.621	0.826 0.802	0.998 1.002	1.203 1.193	1.394 1.418
59	0.612 0.603	0.794 0.804	1.005 0.995	1.233 1.215	1.402 1.388
60	0.611 0.606	0.80 0.815	0.987 1.013	1.186 1.185	1.384 1.413
$\bar{y}'$	0.6114	0.8055	1.00	1.197	1.401
s	0.0148	0.0109	0.0107	0.0159	0.024

Quand nous calculons la droite de régression pour les moyennes, nous trouvons : $y' = 3.941 x + 0.2147$

Calcul du "blanc" des réactifs

Nous pouvons calculer le blanc de la droite de régression : il est égal à la valeur de x pour $y' = 0$. Nous trouvons un blanc de 0.054 μg Zn.

FIGURE 5



3.3.2. Spécificité (essais 43,44,45,46,61,62)

Nous avons examiné l'influence d'autres ions métalliques sur l'extraction du zinc. On peut imaginer qu'un ion gêne l'extraction du zinc en formant des complexes plus stables avec la dithizone. D'autre part, un ion peut aussi augmenter la valeur du résultat, s'il réagit avec les ligands de la phase aqueuse.

Selon Ruzicka et Stary^(R11), le diéthanoldithiocarbamate devrait masquer d'autres ions capables de former des dithizonates. Nous avons expérimenté l'influence des ions Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , As^{3+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} et Sn^{2+} . Nous avons ajouté $10 \mu\text{g}$ de ces métaux à $0.1 \mu\text{g}$ de zinc ; les métaux étaient donc en excès d'un facteur 100. Les solutions ont été extraites avec 1.4 ml de dithizone $1.75 \mu\text{M}$, ce qui correspond à $0.08 \mu\text{g}$ de Zn. Nous avons fait quatre déterminations simultanées et nous avons examiné la signification des différences au moyen du test t selon Student. t a été calculé selon la formule :

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (15)$$

Dans les cas où $n_1 = n_2 = n$, la formule (15) se simplifie :

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}} \cdot \sqrt{n} \quad (16)$$

Certains extraits ont été mesurés dans le colorimètre à filtres LKB à 541 nm. Les résultats sont réunis dans le tableau 11.

Conclusions :

- Le manganèse est l'élément le plus gênant. En présence d'un excès centuple, trois quarts seulement du zinc sont extraits. En présence d'un excès d'un facteur 10, la différence est encore significative, mais plus petite. Dans le sérum, il y a à peu près 500 fois plus de zinc que de manganèse, donc l'interférence devient négligeable.
- Le mercure intervient dans un excès d'un facteur 100, non dans un excès d'un facteur 10.
- L'arsenic semble augmenter l'extraction du zinc de quelques %.
- Pour le plomb, nous avons obtenu des résultats contradictoires. Pourtant, l'interférence est très petite.
- Aucune différence significative n'a été trouvée pour les ions Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ag^{+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} .
- Le cuivre et le fer sont les seuls métaux de transition qui se trouvent dans le sérum et le sang dans des concentrations comparables à celle du zinc.
- Une augmentation de la concentration du tampon n'apporte pas d'avantages.
- La présence des ions principaux contenus dans le sérum, c'est-à-dire Na^{+} , K^{+} , Ca^{2+} et Mg^{2+} , semble augmenter un peu le rendement de l'extraction du zinc. Il sera probablement nécessaire d'utiliser des étalons sériques pour les dosages du zinc dans le sérum.

Tableau 11 : Activité et extinction des extraits en présence
d'autres ions métalliques

addition de	activité (imp./ 2 min)				p	E ₅₄₁
	$\bar{x}$	s	n	t		
<u>essai 43</u>						
Zn seul	30095	1228	4			
10 μ g Co	30914	659	4	1.175	V 0.2	
10 μ g Cu	29100	386	4	1.546	V 0.1	
10 μ g Fe	29806	698	4	0.41	≈ 0.7	
10 μ g Mn	22787	599	4		≈ 0.01	
10 μ g Ni	30256	240	4	0.257	V 0.8	
<u>essai 44</u>						
Zn seul	22359	687	4			
10 μ g Ag	22323	1162	4	0.053	V 0.9	
10 μ g As	23603	508	4	2.91	≈ 0.025	
10 μ g Cd	22200	179	4	0.447	V 0.6	
10 μ g Hg	20267	1077	4	3.27	V 0.02	
10 μ g Pb	23004	542	4	1.474	V 0.1	
<u>essai 45</u>						
Zn seul	24170	1448	4			0.066
10 μ g Cu	24823	1419	4	0.641	V 0.5	0.064
10 μ g Hg	22797	1082	4	1.519	V 0.1	0.059
10 μ g Mn	20527	421	3	5.42	≈ 0.01	0.055
10 μ g Sn	23379	1318	3	0.97	V 0.3	0.065
<u>essai 46</u> (double quantité de tampon)						
Zn, 2 ml tampon	25385	3185	4			0.075
Zn, 4 ml "	20534	1194	4			0.057
10 μ g As	21380	1564	4	0.859	V 0.4	0.061
10 μ g Hg	19716	583	4	1.23	V 0.2	0.056
10 μ g Mn	15647	620	3		≈ 0.01	0.045
10 μ g Pb	18030	509	3	4.38	≈ 0.01	0.067
<u>essai 61</u>						
Zn seul	32145	808	4			0.067
10 μ g Co	32584	400	4	0.974	V 0.3	0.067
10 μ g Cu	32992	623	4	1.66	V 0.1	0.068
10 μ g Fe	31871	705	4	0.511	V 0.6	0.068
10 μ g Pb	32737	600	4	1.17	V 0.2	0.069

Tableau 11 (suite)

addition de	activité $\bar{x}$	s	n	t	p	E_{541}
<u>essai 62</u>						
Zn seul	33757	271	3			0.067
1 μ g Cu	34043	369	4	1.471	$\approx$ 0.2	0.066
1 μ g Hg	33486	123	4	2.37	$>$ 0.05	0.065
1 μ g Mn	34435	192	4	5.12	$\ll$ 0.01	0.067
* 0.2 ml "sérum"	33302	122	3	2.65	$>$ 0.05	0.068

* "sérum" : 3300 mg Na^+ + 150 mg K^+ + 100 mg Ca^{2+}
+ 20 mg Mg^{2+} par litre (correspond au sérum).

Pour la détermination de p, le nombre de degrés de liberté
est égal à $(n_1 + n_2 - 2)$.

CHAPITRE 4

DOSAGE DU ZINC DANS LE SÉRUM

4.1. Problèmes du dosage dans le sérum

Dans une deuxième phase, l'extraction substoechiométrique a été appliquée au dosage du zinc dans le sérum. Bien que, récemment, un grand nombre de travaux sur la détermination du zinc sérique aient paru, la dilution isotopique substoechiométrique n'a été appliquée que très rarement à la matière biologique. A notre connaissance, il n'y a que les groupes de travail de Bizollon^(B4) et Vrignaud^(V5,V6) qui l'ait utilisée pour le dosage du zinc sérique.

Comme nous l'avons discuté auparavant, le sérum contient environ $1 \mu\text{g}$ de zinc par ml; le zinc y est lié à des protéines. Avant de le déterminer, il faut le séparer de sa liaison protéique. Ceci devrait être possible par l'addition d'un complexant formant un complexe plus stable que les protéines, ou par acidification à des pH au-dessous de 2^(V3,V4,P10). Une simple dénaturation ne suffit pas. D'autre part, il faut considérer que la constante d'extraction du $\text{Zn}(\text{Dz})_2$ dans CCl_4 a une valeur de ≤ 200 seulement et est encore diminuée par la présence de ligands dans la phase aqueuse^(R11). Ceci ne permet pas d'utiliser un complexe très stable pour séparer le zinc des protéines ; on est obligé de choisir un ligand relativement faible ou de détruire le complexe avant l'extraction à la dithizone.

Dans une série d'expériences, nous avons comparé plusieurs ligands possibles ; c'est l'acide chlorhydrique qui a donné les meilleurs résultats. Les liaisons zinc-protéine sont détruites par l'acidification, et le zinc est en partie transformé en chlorocomplexes.

Quant aux protéines, elles forment des émulsions avec la phase organique lors de l'extraction ; elles doivent être précipitées après la séparation du zinc.

La détermination du zinc sérique comprend donc les opérations suivantes :

- séparation du zinc de sa liaison protéique
- précipitation des protéines
- neutralisation du surnageant
- extraction substoechiométrique proprement dite.

4.2. Mise au point de la méthode

4.2.1. Choix d'un complexant pour la séparation du zinc des protéines

Nous avons ajouté des complexants différents à des échantillons de sérum d'une teneur connue de zinc ; après la précipitation des protéines, le zinc dans le surnageant a été déterminé par extraction substœchiométrique. Les mêmes quantités des mêmes complexants ont été ajoutées également aux étalons aqueux, pour tenir compte du blanc.

Mode opératoire :

1. A 1 ml de sérum on ajoute une quantité définie du complexant à étudier. Le traceur ^{65}Zn est ajouté ; de préférence il est mélangé avec le complexant. On utilise des tubes en polystyrène lavés au "Déconex".
2. A partir d'une solution stock de 1.00 mg Zn/ml, on prépare des étalons aqueux de 1.0, 2.0 et 3.0 μg de Zn par ml. A 1 ml de chaque étalon on ajoute la même quantité de complexant et de traceur qu'aux sérums.
3. Après un délai de 1 à 3 heures, les protéines sont précipitées avec de l'acide trichloroacétique à 20 %. Celui-ci est ajouté également aux étalons aqueux. Les sérums sont agités pendant 10 minutes sur un agitateur, puis centrifugés pendant 15 minutes à 1800 g.
4. Plusieurs volumes aliquotes, 200 à 500 μl chacun, des surnageants déprotéinisés et des étalons sont pipetés dans des tubes de centrifugeuse à couvercles filetés.

Une goutte de naphthol-1-phthaléine est ajoutée, et on neutralise avec de la soude 0.5 M jusqu'au virage au bleu (pH 7.1 - 8.3).

5. 2 ml de tampon ammoniac-diéthanoldithiocarbamate et 5 ml d'eau désionisée sont ajoutés. Le pH est contrôlé au moyen d'une électrode de verre ; il doit être entre 7.7 et 8.3.
6. Les solutions sont extraites avec 1.4 ml (1.6 ml pour quelques essais) de dithizone 1.6 à 2 μ M dans du CCl_4 . Les solutions sont agitées pendant 15 minutes.
7. Les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 800 g. La phase aqueuse est aspirée, et 1 ml de la phase organique est pipeté dans un tube de comptage en polypropylène.
8. Les tubes sont comptés dans un compteur à scintillation automatique Packard 5220. On choisit un nombre fixe d'impulsions, soit 10'000 à 40'000.
9. Pour déduire la concentration de zinc dans les échantillons inconnus, on peut tracer une courbe d'étalonnage : les temps de mesure en fonction de la concentration des étalons ; ou bien on peut calculer la droite de régression.

Les sérums

Actuellement encore, on trouve peu de sérums de contrôle ayant des teneurs calibrées en zinc. Nous avons été obligés de calibrer nous-mêmes des sérums par absorption atomique. Ces sérums de contrôle sont en général lyophilisés et distribués dans des flacons de 5 ml. Les premières valeurs de référence se basaient sur l'analyse d'un seul flacon pour chaque lot de sérum. Par la suite, étant donné que les analyses d'extraction substoechiométrique donnaient systématiquement des résultats inférieurs, nous avons mis en doute ces valeurs, et nous avons préparé nous-mêmes des pools de ces sérums que nous avons distribués en portions de 1 ml dans des tubes de polystyrène lavés. Ces tubes ont été congelés. 4 échantillons de chaque pool ont été analysés par absorption atomique. Les résultats furent les suivants :

Leder-Norm Lot 2905-428 (LN) :	1.1/1.1/1.1/1.1 $\mu\text{g Zn/ml}$
LabTrol Lot LT-52 (LT) :	0.7/0.7/0.7/0.7 $\mu\text{g Zn/ml}$
Séronorm Lot 128 (SN) :	0.9/0.9/0.9/1.0 $\mu\text{g Zn/ml}$
pool (restes du labo) (P) :	0.9/0.9/0.9 $\mu\text{g Zn/ml}$

Ces valeurs nous servaient de référence pour les analyses par extraction substoechiométrique.

On peut imaginer que les premiers flacons analysés étaient contaminés au zinc, puisque le zinc est très répandu et que le producteur du sérum de contrôle ne vérifie pas sa concentration; ou, peut-être, y avait-il des variations dans le remplissage, comme nous l'avons observé en laboratoire pour d'autres composants du sérum.

Résultats des essais

Les résultats des essais avec des complexants différents sont réunis dans le tableau 12.

Nous avons utilisé des volumes différents de sérum, de complexants et d'acide trichloroacétique. Pour qu'on puisse les comparer, les concentrations des complexants indiquées dans le tableau 12 se rapportent au mélange sérum-complexant et celles de l'acide trichloroacétique au mélange sérum-complexant- CCl_3COOH . Pour les essais 75 - 78, le traceur a été ajouté après la déprotéinisation.

A la suite de ces essais, nous avons opté pour le ion chlorure, c'est-à-dire l'acide chlorhydrique. Il s'agissait, alors, de choisir une concentration donnée pour les essais futurs.

4.2.2. Déprotéinisation

Pour précipiter les protéines, on utilise couramment des solvants organiques comme l'éthanol ou l'acétone, ou des acides comme l'acide trichloroacétique ou l'acide perchlorique. Les solvants organiques forment une émulsion avec le tétrachlorure de carbone ; nous avons donc choisi l'acide trichloroacétique à 20 %.

TABLEAU 12

Résultats trouvés pour :

essai no.	complexant	CCl_3COOH	LederNorm $\mu\text{g Zn/ml}$	Séronorm $\mu\text{g Zn/ml}$	LabIrol $\mu\text{g Zn/ml}$	Réf.
75	HCl 0.02 M	10 %	1.22			
76	HCl 0.02 M	10 %	1.20/1.24/1.18			
77	HCl 0.02 M	10 %	1.07/1.13/0.99			
78	HCl 0.02 M	10 %	1.25			
81	HCl 0.02 M	10 %	1.14/1.16/1.06/1.08/1.30			
83	EDTA 10^{-7}M + Al^{3+}	10 %	-			
85	HCl 0.16 M + HAsc 0.8 %	7.3 %	1.09/1.11/1.13/1.11/1.19			C1
86	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10^{-7}M	10 %	1.11/1.07/1.02/1.10/1.12			
87	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10^{-5}M	10 %	1.14/1.12/1.08/1.02/1.24			
88	EDTA 10^{-7}M	10 %	1.45/1.53/1.66/1.30/1.47			
91	tartrate 10^{-2}M	10 %	1.07/1.05/0.95	0.70/0.70/0.90		
92	HCl 3 M, 95°C	10 %	1.06/1.00/0.92	0.76/0.72/0.68		
93	HCl 1 M	10 %	0.98/0.98/0.92	0.89/0.86/0.85	0.57/0.60/0.55	

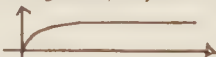
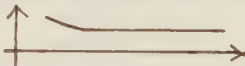
TABLEAU 12 (suite)

essai no.	complexant	CCl_3COOH	LederNorm $\mu\text{g Zn/ml}$	Séronorm $\mu\text{g Zn/ml}$	LabTrol $\mu\text{g Zn/ml}$	Réf
94	HCl 0.16 M + HAsc 0.8 %	7.3 %	1.18/1.07/1.10	0.93/0.83/0.84	0.59/0.53/0.54	C1
95	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 5 10^{-5} M, puis HCl 0.16 M	7.3 %	1.08/1.00/1.03	0.87/0.87/0.85	0.60/0.75/0.63	
96	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 2 10^{-4} M, puis HCl 0.16 M	7.3 %	1.19/1.17/1.15	0.98/0.96/0.95	0.63/0.66	
97	AgNO_3 0.45 mM, puis HCl 0.16 M + HAsc 0.8 %	7.3 %	1.03/1.00/1.09	0.80/0.80/0.82	0.49/0.50/0.50	
98	o-phenanthroline 1 mM	-	-	-	-	
99	HCl 0.066 M	5 %	1.09/1.09/1.18	0.75/0.73	0.65/0.65/0.68	B4

4.2.3. Influence de la concentration de HCl sur la séparation du zinc des protéines. (essais 112, 113)

Des échantillons de 1 ml de sérum (LederNorm) ont été incubés pendant 2 heures avec 0.5 ml de HCl de concentrations différentes. Les protéines ont été précipitées avec 0.5 ml de CCl_3COOH à 20 %. Dans l'essai 112, le traceur, environ $2 \mu\text{C}$ de ^{65}Zn par ml de sérum, a été ajouté au CCl_3COOH ; dans 113, environ $20 \mu\text{C}$ ont été mélangés à 10 ml de sérum tout au début de l'expérience. - Plusieurs aliquots de $300 \mu\text{l}$ du surnageant ont été extraits. Nous avons comparé l'activité des phases organiques. De plus, dans l'essai 112, nous avons calculé la teneur de zinc à l'aide d'étalons aqueux auxquels il a été ajouté du HCl 0.2 M.

Les résultats sont présentés dans le tableau 13 et dans la figure 6. Ils montrent que le rendement de la séparation est constant pour des concentrations de HCl entre 0.05 M et 1 M. Pour les essais suivants, nous avons utilisé de l'HCl 0.2 M pour séparer le zinc des protéines.

Quand on mélange le traceur directement au sérum, au début de l'expérience, une séparation incomplète donne une activité trop faible de la phase organique, et on s'attend à trouver une courbe de la forme  , comme nous la trouvons dans les essais 113 et 114. Par contre, si le traceur est ajouté après la séparation, une séparation incomplète mène à une activité spécifique trop élevée de la phase organique, et on obtient une courbe  comme pour 112.

4.2.4. Influence du temps d'incubation (essai 114)

Afin de déterminer le temps d'incubation nécessaire, nous avons ajouté environ 20 μC de ^{65}Zn à 10 ml de sérum ; des échantillons de 1 ml ont été incubés pendant 0, 15, 30, 60, 120 et 180 min. Les protéines ont été précipitées avec 0.5 ml de CCl_3COOH 20 %. 4 x 300 μl de chaque surnageant ont été extraits, et les activités des phases organiques purent être comparées.

Nous donnons les résultats dans le tableau 14 et dans la figure 7. Ils montrent que la séparation du zinc des protéines est complète après 30 minutes ; une incubation plus courte semble donner une séparation incomplète.

Ceci pourrait signifier pour l'analyse automatisée qu'il faudrait ajouter l'acide chlorhydrique aux échantillons de sérum avant de les introduire dans le dialyseur.

TABLEAU 13

essai 112

<u>HC1</u>	<u>imp./2 min./</u> <u>ml phase org.</u>	<u>$\bar{x} \pm s$</u>	<u>$\mu\text{g Zn/ml}$ trouvés</u>
0.02 M	16183,16478,16039	16230 $\pm$ 220	1.02/1.016/1.02
0.05 M	15741,15832,16000	15860 $\pm$ 130	1.08/1.03/1.03
0.10 M	15787,15900,15238	15640 $\pm$ 350	1.045/1.056/1.085
0.20 M	15662,15795,15726	15740 $\pm$ 50	1.063/1.063/1.063
0.50 M	15549,15961,15774	15760 $\pm$ 205	1.10/1.065/1.045
1.00 M	15883,15457,15632	15660 $\pm$ 210	1.033/1.085/1.09

essai 113

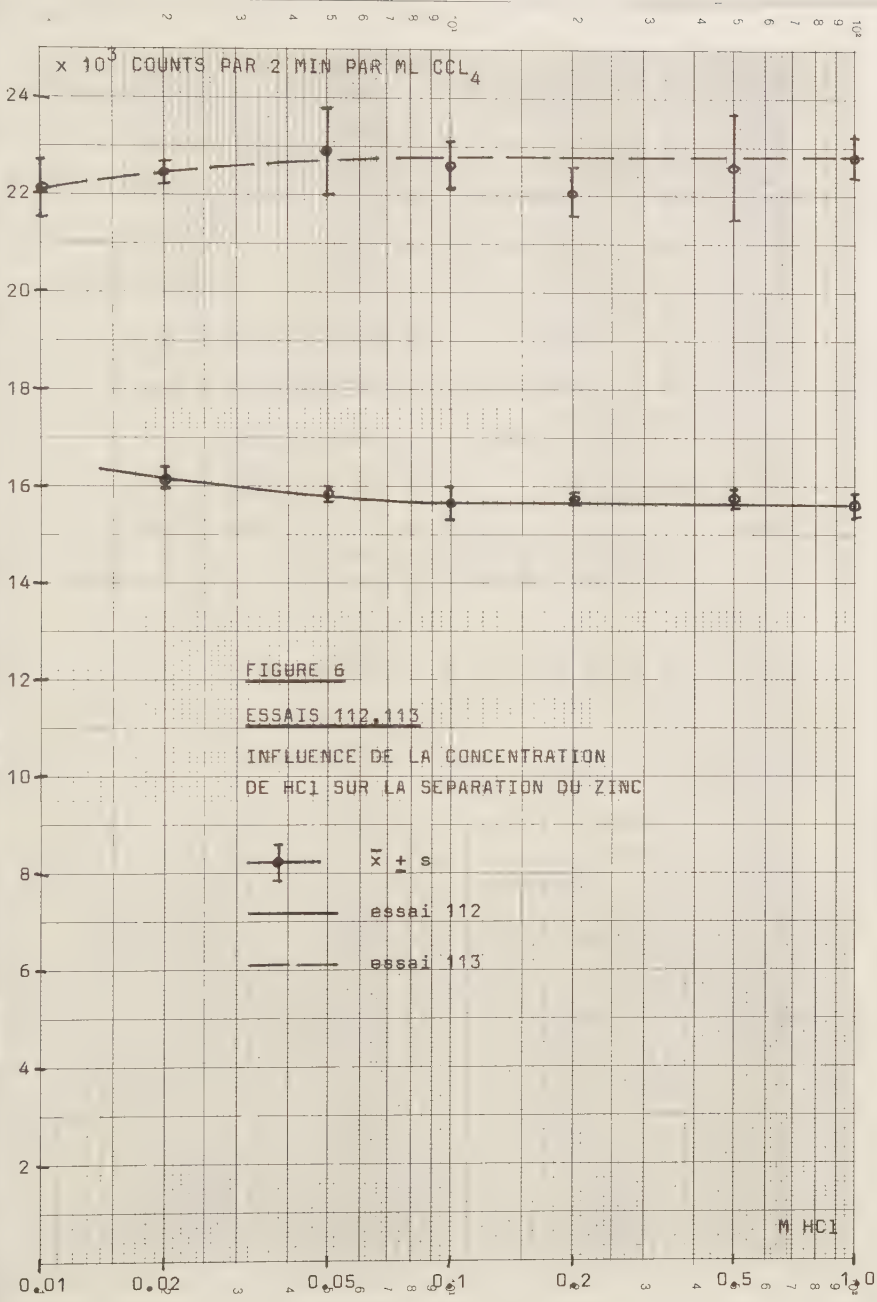
<u>HC1</u>	<u>imp./2 min./</u> <u>ml phase org.</u>	<u>$\bar{x} \pm s$</u>
0.01 M	21321,22446,22748,22119	22158 $\pm$ 615
0.02 M	22539,22481,22333,22663	22504 $\pm$ 137
0.05 M	23538,23531,21674,22991	22913 $\pm$ 877
0.10 M	22048,22556,22813,23122	22634 $\pm$ 454
0.20 M	22596,21846,21695	22045 $\pm$ 482
0.50 M	23361,22882,23115,20942	22575 $\pm$ 1106
1.00 M	22853,22600,22381,23284	22780 $\pm$ 388

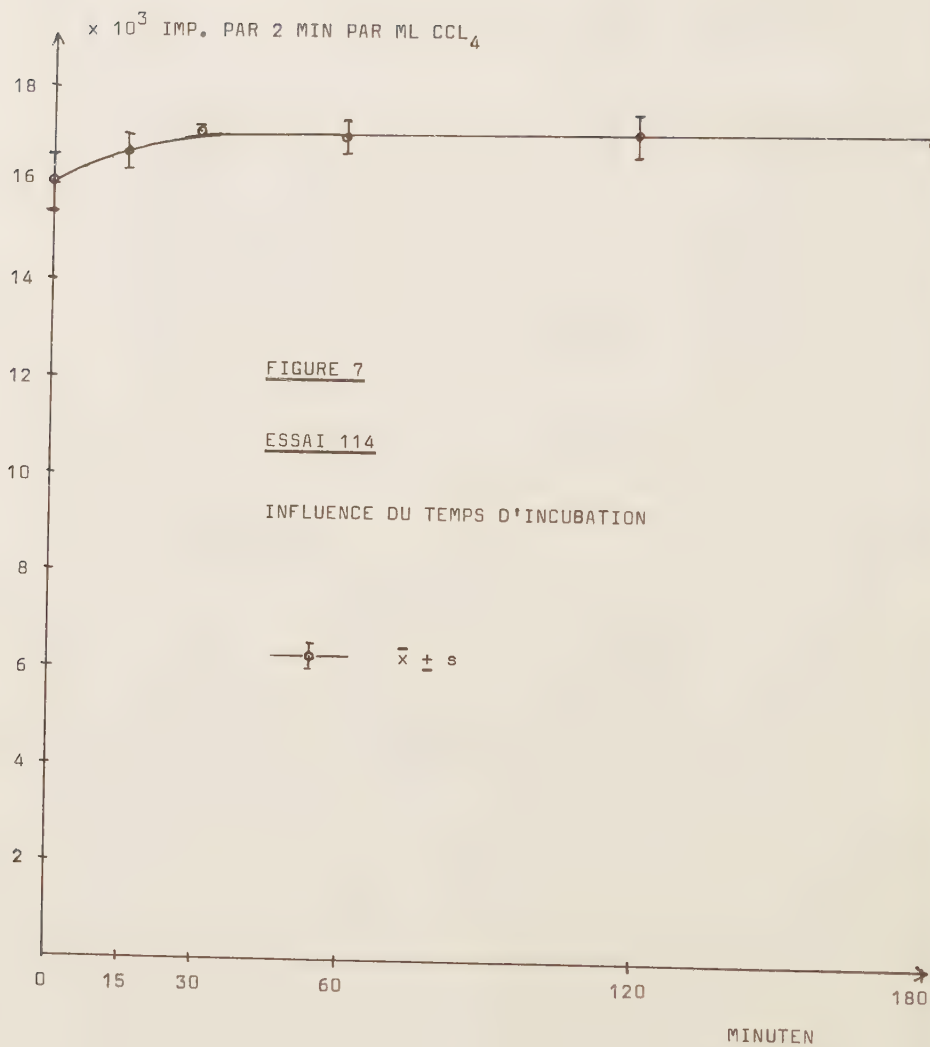
TABLEAU 14

essai 114

<u>temps</u>	<u>imp./2min./</u> <u>ml de phase org.</u>	<u>$\bar{x} \pm s$</u>
0 min	15197,16134,16702,16407	16110 $\pm$ 650
15 min	16895,17067,16370,16589	16721 $\pm$ 305
30 min	17062,17140,17011,17147	17090 $\pm$ 65
60 min	17214,16754,16822,16534	16831 $\pm$ 283
120 min	16615,16671,17166,17304	16940 $\pm$ 347
180 min	16767,16675,16874,16974	16822 $\pm$ 130

Logar. Division } 100, Einheit } 83,38 mm





4.3. Evaluation de la méthode

4.3.1. Tests de la précision (essais 100 - 107, 115)

Dans les essais 100 à 106, nous avons examiné la précision des différentes opérations de l'analyse, en vue de l'améliorer.

Nous en avons tiré les conclusions suivantes :

- les solutions diluées de $\sim 1 \mu\text{g Zn/ml}$ sont stables pendant plusieurs heures ;
- il n'y a pas de perte de traceur due à des adsorptions ;
- les opérations qui sont à l'origine de la plus grande dispersion des résultats sont la déprotéinisation et le prélèvement de 1 ml de phase CCl_4 pour le comptage ;
- on peut améliorer la précision des résultats, si on décante le surnageant déprotéinisé et le centrifuge une deuxième fois, et si on extrait avec 1.6 ml de dithizone au lieu de 1.4 ml.

Evidemment, il faut éviter soigneusement toute contamination en zinc.

Quelques résultats

Dans tous ces essais, 2 volumes de sérum marqué de 1 à 3 μC de ^{65}Zn par ml ont été incubés avec 1 volume de HCl 0.2 M et déprotéinisés avec 1 volume de CCl_3COOH 20 %. Les surnageants ont été décantés et centrifugés une deuxième fois. Pour les essais 107 et 115, 300 μl du surnageant ont été extraits avec 1.6 ml de dithizone environ 1.8 μM . Les activités de 1 ml de la phase organique purent être comparées.

Nous donnons les résultats dans le tableau 15.

TABEAU 15

essai 105b : extraction de 10 x 300 μ l provenant du même sur-nageant déprotéinisé, avec 1.4 ml de dithizone :

impulsions par 2 min par ml de phase organique :

28789 , 26997, 28296, 28207, 28163, 27286, 29034, 28160,
29439, 28064.

N = 10 $\bar{x}$ = 28244 s = 735 coeff.de var. = 2.6 %

essai 106 : extraction de 9 x 300 μ l provenant du même sur-nageant déprotéinisé, avec 1.6 ml de dithizone :

impulsions par min par ml de phase organique :

24107, 23672, 24317, 24626, 24901, 24817, 24383, 24979,
24778.

N = 9 $\bar{x}$ = 24466 s = 394 CV = 1.6 %

essai 107 : 10 extractions différentes de 1 ml du même sérum (LederNorm)

impulsions par 4 min par ml de phase organique :

31956, 32596, 31485, 32139, 32205, 29534, 30845, 31218,
31343, 32973.

N = 10 $\bar{x}$ = 31629 s = 984 CV = 3.1 %

essai 115 : 10 extractions différentes du même sérum ;

115 a : Séronorm 115 b: pool de restes du labo

impulsions par 2 min par ml de phase organique :

115 a: 17281, 18251, 18691, 17648, 17662, 18436, 17739,
17526, 18095, 18545.

N = 10 $\bar{x}$ = 17987 s = 481 CV = 2.67 %

115 b: 25037, 24564, 23693, 23048, 24355, 24394, 22628,
23807, 24482, 24529.

N = 10 $\bar{x}$ = 24054 s = 751 CV = 3.1 %

4.3.2. Tests de l'exactitude (essais 109-111, 116, 117)

4.3.2.1. Compatibilité des résultats avec les valeurs de référence.

Dans les essais 109 à 111, nous avons comparé nos résultats obtenus au moyen des sérums LederNorm, LabTrol, Séronorm et d'un pool de restes du laboratoire, aux valeurs de référence trouvées par absorption atomique. Dans ces déterminations, 1 ml de sérum a été incubé avec 0.5 ml de HCl 0.2 M et avec le traceur ^{65}Zn de 1 à 2 heures ; les protéines ont été précipitées avec 0.5 ml de CCl_3COOH 20 %. 300 μl du surnageant ont été extraits avec 1.6 ml de dithizone 1.8 μM .

Nous donnons les résultats dans le tableau 16.

4.3.2.2. Essais de surcharge (essais 116, 117)

A d'autres échantillons de sérum nous avons ajouté des quantités connues de zinc. Ces dosages ont été effectués de la même manière que les essais précédents.

Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

On constate que les valeurs trouvées par dilution isotopique sont légèrement inférieures à celles obtenues par absorption atomique, et que les quantités ajoutées sont retrouvées dans l'analyse. Du tableau 16, on peut calculer la corrélation entre les valeurs obtenues par absorption atomique (x) et celles trouvées par dilution isotopique (y) :

$$\underline{y = 1.019 x - 0.069} \quad \underline{r = 0.947}$$

TABLERAU 16 : μg de zinc par ml trouvés :

<u>essai</u>	<u>LederNorm</u>	<u>LabTrol</u>	<u>Séronorm</u>	<u>pool</u>
abs.at	1.1	0.7	0.9	0.9
109	0.99/ 0.99 1.08/ 1.00	0.65/ 0.57 0.61/ 0.64	0.81/ 0.96 0.83/ 0.88	0.85/ 0.85 0.79/ 0.84
110	1.04/ 1.07 1.04	0.65/ 0.67 0.70	0.88/ 0.88 0.88	0.83/ 0.87 0.80
111	1.04/ 1.07 1.03	0.59/ 0.61 0.58	0.83/ 0.85 0.82	0.96/ 0.94 0.98

TABLERAU 17

<u>essai 116</u>	<u>zinc</u> <u>calculé</u>	<u>zinc</u> <u>trouvé</u>
LN	1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.05/1.02/1.05/1.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$
LN + 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.52/1.52/1.55/1.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$
LN + 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.10/2.12/2.08/2.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$
LN + 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.60/2.61/2.61/2.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$
<u>essai 117</u>		
SN	0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.95/0.94/0.92/0.92 $\mu\text{g}/\text{ml}$
SN + 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.43/1.41/1.42/1.47 $\mu\text{g}/\text{ml}$
SN + 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.90/1.97/1.99/1.99 $\mu\text{g}/\text{ml}$
SN + 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2.45/2.46/2.52/2.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

CHAPITRE 5

AUTOMATISATION

5.1. Introduction

Dans une troisième partie de ce travail, nous avons essayé d'automatiser l'extraction substoechiométrique du zinc au moyen du Technicon AutoAnalyzer II.

Ruzicka, Stary et leurs collaborateurs ont eux-mêmes proposé une telle automatisation de leur technique, et ils l'ont adapté également au Technicon AutoAnalyzer^(B10,L1,L2,R9,R11-13,S7).

Ainsi, ils ont développé une détermination substoechiométrique de traces de mercure dans la matière biologique : la minéralisation et l'addition du traceur ^{203}Hg sont faites à la main, tandis que l'extraction avec $\text{Zn}(\text{Dz})_2$ est automatisée^(B10,R12,R13). De même, ils ont mis au point un dosage automatique du phosphore^(L1). Là, le phosphore forme, avec un excès de molybdate et une quantité substoechiométrique de zircone, un complexe soluble dans l'eau, tandis que le reste du phosphore est extrait avec du butanol-chloroforme.

Après la séparation, l'activité de la phase qui contient le composé substoechiométrique est mesurée avec un compteur à flux continu. Dans certains cas, un procédé de séparation préalable ou de préconcentration est nécessaire. Le traceur radioactif est ajouté au début. Des pertes importantes au cours de ce procédé mènent à des résultats erronés, si la quantité extraite dépend de la concentration totale, ou si l'extraction devient quantitative. Dans ces cas, Lamm et Ruzicka^(L1,L2,S7)

proposent de mesurer l'activité totale avant la séparation substoechiométrique avec un deuxième compteur et de déduire des facteurs de correction pour les pertes d'activité.

Rappelons brièvement le principe de l'extraction automatique (T1): des volumes déterminés de réactifs aqueux et organiques et de l'échantillon sont introduits dans un courant analytique continu au moyen d'une pompe péristaltique à vitesse constante et de tubes à diamètres définis. Le courant analytique est segmenté par des bulles d'air. L'extraction se produit dans des bobines de verre horizontales. Quand le courant analytique passe par les bobines, les bulles de la phase plus dense traversent plusieurs fois la phase plus légère, et la substance qu'on veut extraire passe de la phase aqueuse à la phase organique. En plus, la friction contre les parois de verre produit un courant de convection à l'intérieur des bulles de liquide. Celui-ci aide à la distribution homogène de la substance extraite et au renouvellement constant de la surface des deux liquides. Les phases sont ensuite séparées par gravité, et une partie aliquote de la phase organique passe dans le détecteur, soit un colorimètre, un compteur à scintillation ou tout autre moyen de détection.

5.2. Matériaux et méthodes

Pour adapter l'extraction substoechiométrique du zinc à l'Auto-Analyzer, nous avons donc dû développer un circuit analytique, trouver les paramètres de l'analyse, choisir une méthode d'évaluation des résultats et mettre au point une méthode pour déprotéiniser les échantillons de sérum.

5.2.1. Composants du circuit analytique

Tubes de pompe : pour les solutions aqueuses et l'air, nous avons utilisé des tubes "Standard Tygon". Par contre, les solutions de CCl_4 posaient quelques problèmes. Nous avons tout d'abord effectué des essais avec des tubes en "Acidflex" rouge, puis avec des tubes en "Acidflex" noir, comme recommandé par la maison Technicon. Pourtant, ni les uns ni les autres ne supportent, à la longue, l'action de CCl_4 : ils se décomposent lentement, les débits changent et les particules de tube passent dans le circuit analytique. La technique de déplacement^(T1) pourrait être utilisée pour le pompage de la solution de dithizone, mais non pour la phase organique séparée. Il est donc indispensable de changer souvent les tubes. La cuve de mesure du colorimètre peut être nettoyée par ultrason.

Tubes de transmission : pour la liaison entre les parties du circuit analytique, nous avons utilisé des tubes de transmission en "Standard Tygon" ou en "Acidflex" noir, ou en verre. Les tubes de transmission n'ont pas posé de problèmes.

Séparateur de phases : nous avons utilisé le séparateur de phases Technicon 021-G001-01 avec une pièce de téflon incorporée 021-0002-02 :

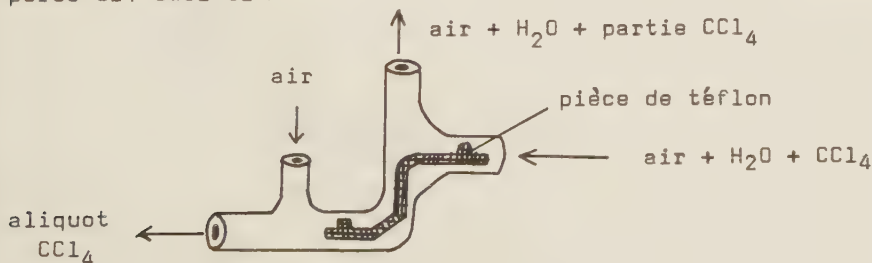


figure 8 : séparateur de phases

Bobines d'extraction : des bobines no. 196-0002-01 (20 tours) et no. 157-0251 (10 tours) ont servi pour l'extraction.

Dialyseurs : pour les essais de dialyse, deux dialyseurs d'une longueur de 24" (61 cm) ont été montés en série.

5.2.2. Circuit analytique : schémas de flux

Lorsqu'on adapte une méthode manuelle à l'automatisation, Technicon recommande^(T1) de tracer d'abord un schéma qui maintient le rapport des volumes de la méthode manuelle. Il est modifié par la suite afin de trouver la sensibilité désirée et les paramètres optima.

Pour les premiers essais, nous avons monté le schéma A que nous avons modifié successivement pour arriver au schéma D. La plupart des essais sur des solutions standard aqueuses ont été effectués au moyen du schéma D. Celui-ci contient plus de bobines d'extraction que A, et la phase aqueuse est moins diluée. Pour les essais sur des échantillons de sérum, nous avons utilisé le schéma G.

Les figures 9 - 15 montrent l'appareil et les schémas de flux.

figure 9 : schéma A

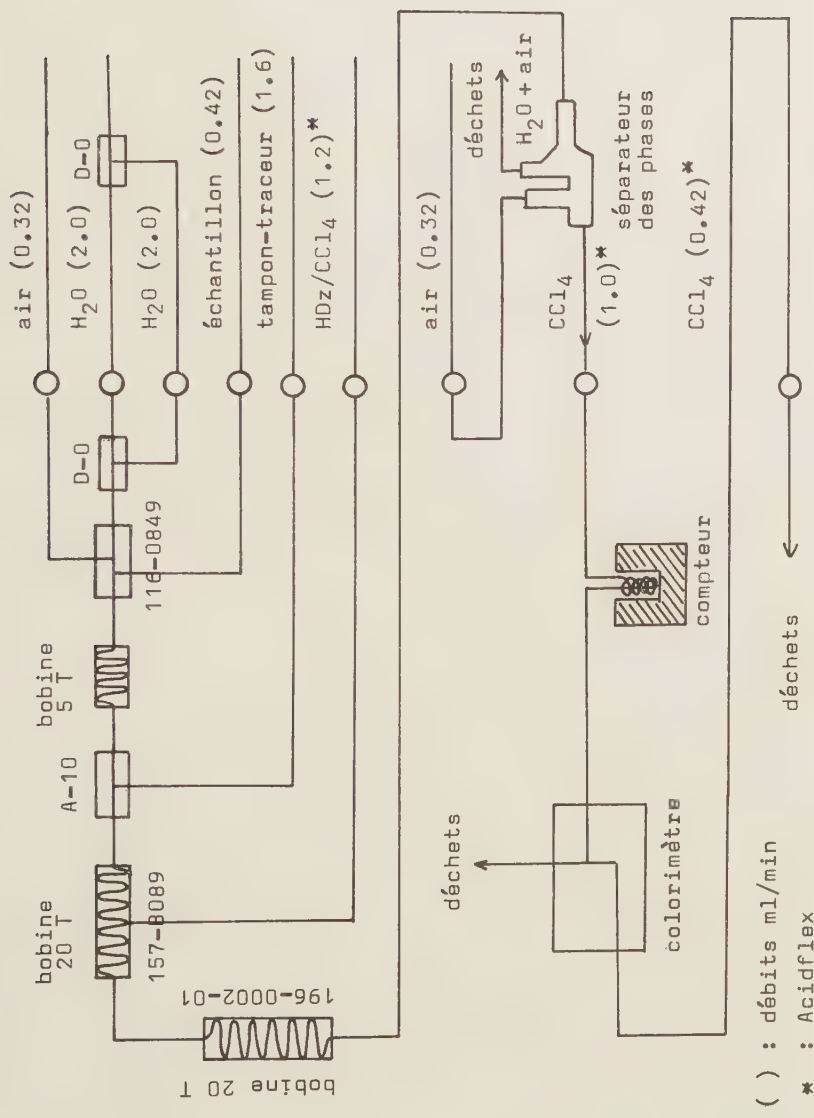


figure 10 : schéma D

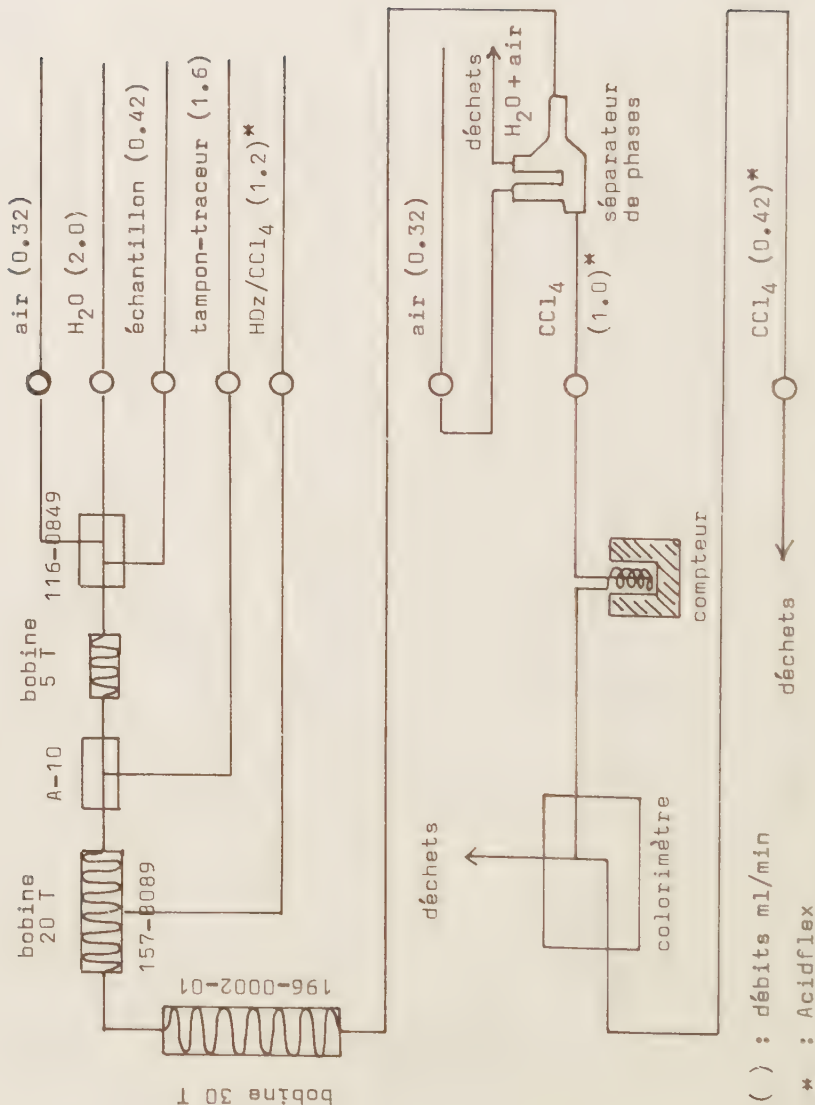


figure 11 : schéma G

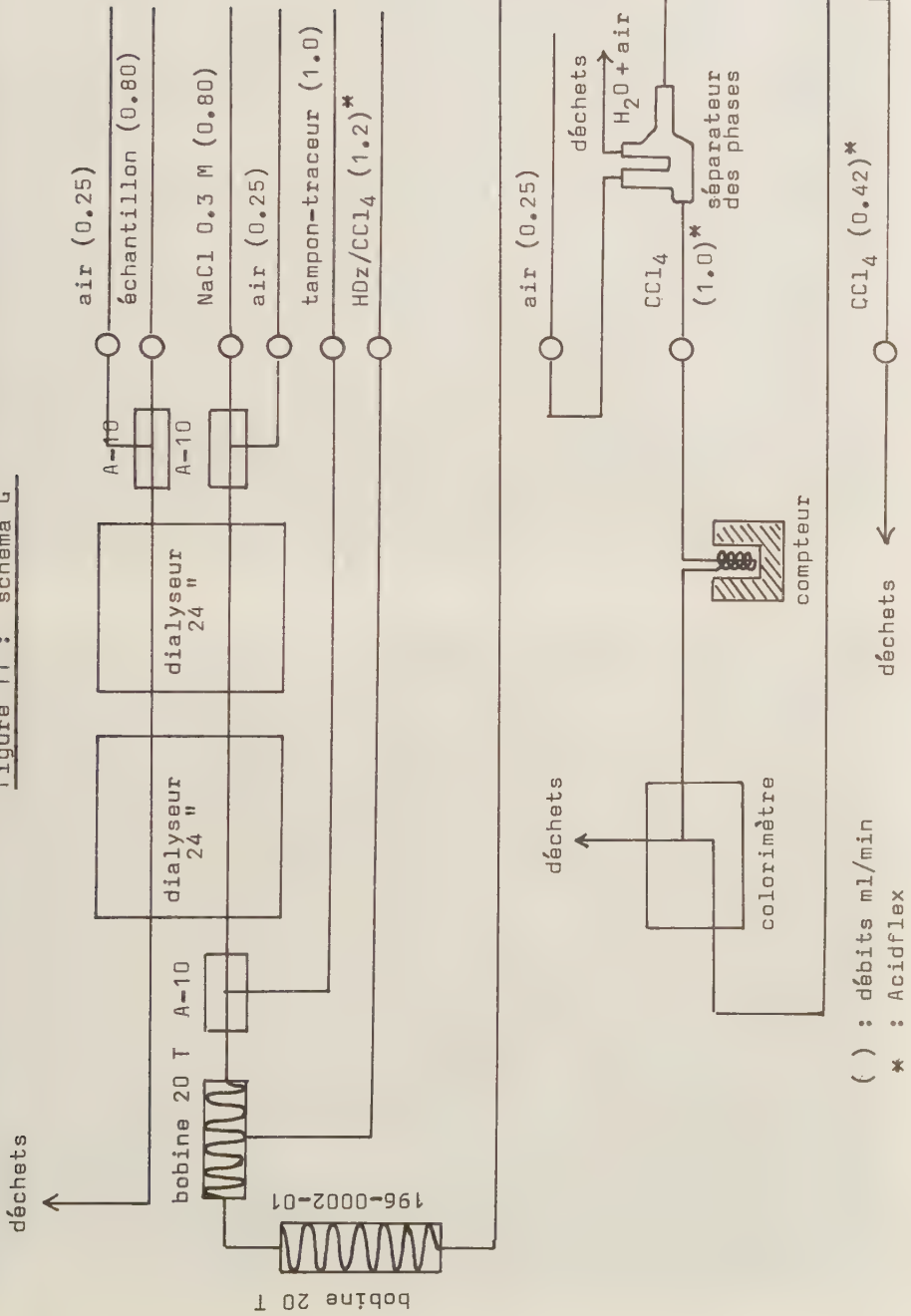




figure 12 : vue de l'AutoAnalyzer



figure 13 : distributeur d'échantillons
et circuit analytique

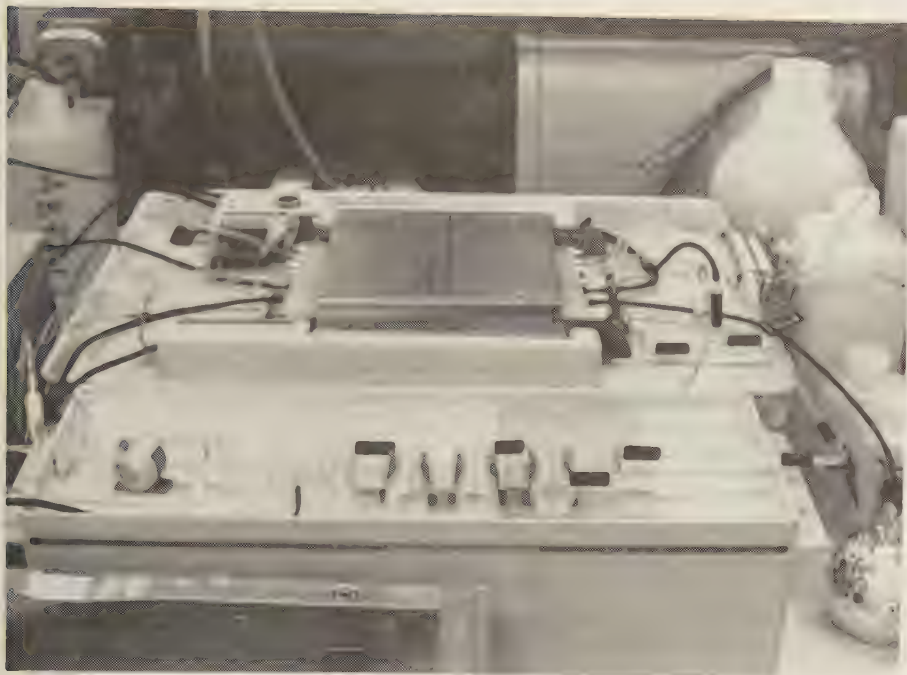


figure 14 : schéma D



figure 15 : schéma C

5.2.3. Les détecteurs

Dans la plupart des essais, nous avons utilisé deux détecteurs en série : nous avons successivement mesuré la radioactivité de la phase organique séparée, puis sa densité optique relative. Comme on le voit sur les schémas, nous avons fait passer un aliquot de la phase CCl_4 , segmenté par de l'air, dans le compteur à scintillation, puis dans le colorimètre. Les résultats ont été calculés à partir des mesures d'activité. L'enregistrement des pics au colorimètre a servi de contrôle.

Le colorimètre n'était pas calibré. Dans certains essais d'optimisation, où il ne s'agissait que de comparer une série de densités optiques, nous avons utilisé le colorimètre seul. Dans ce cas, nous avons branché le séparateur de phases directement sur le colorimètre.

Compteur à scintillation

Il s'agit d'un compteur Landis und Gyr avec un analyseur d'impulsions et une imprimante, équipé d'un cristal creux $\text{NaJ}(\text{Tl})$ $1\frac{3}{4}$ " x 2", dans un château de plomb de 7 cm d'épaisseur. La cellule de mesure est une spirale de verre d'un diamètre extérieur de 14 mm, une longueur de 48 mm et une capacité de 0.5 ml. Nous avons choisi une tension de 700 V pour l'alimentation du photomultiplicateur et de 3 V pour le seuil du discriminateur. Pour surveiller le fonctionnement propre de l'instrument, nous avons mesuré le blanc et deux sources étalon au début de chaque série de mesures. Nous avons préparé des séries de solutions avec des activités jusqu'à 50'000 ipm sans observer de pertes par coïncidence : l'activité des solutions de mesure n'a jamais dépassé 15'000 ipm.

Colorimètre

Nous avons utilisé le colorimètre monocanal Technicon avec un filtre de 535 nm et une cuve à flux continu, type 199-8018-01 ayant un passage optique de 15 mm et un diamètre intérieur de 1.5 mm. Les tubes de liaison sont en "Acidflex" noir.

La sensibilité peut être réglée au moyen du bouton "Standard Calibration". Une courbe d'étalonnage donne la relation entre la valeur de "Standard Calibration" et l'absorbance qui correspond à 100 % de l'échelle. Nous n'avons pas vérifié ce calibrage. Les résultats des mesures colorimétriques sont donnés en % de l'échelle (densité optique relative).

5.2.4. Addition du traceur (R12)

Il y a deux possibilités d'introduire le traceur dans le courant analytique : soit l'ajouter aux échantillons (à la main), soit l'introduire dans un flux continu. On obtiendra alors des réponses différentes suivant le mode choisi.

Quand on mélange le traceur aux échantillons, on trouve des pics avec une activité inversement proportionnelle à la quantité de la substance à doser (fig. 16a). Si un prétraitement de l'échantillon, manuel ou automatique, est nécessaire, il peut être avantageux d'ajouter le traceur aux échantillons tout au début du procédé.

Par contre, si on introduit le traceur dans un flux continu, on obtient des pics "négatifs" : l'activité maximum est extraite avec le blanc, et la dépression de l'activité est proportionnelle à la quantité de la substance à doser (fig. 16b).

L'addition continue du traceur est plus reproductible, plus commode et plus économique aussi. Toutefois, dans les deux cas, la courbe d'étalonnage est une droite si l'extraction est strictement substoechiométrique, et on observe une déviation de cette droite, si $m = f(x, y)$.

Pour la détermination simple du zinc, nous avons utilisé les deux possibilités citées plus haut. Mais lorsqu'une dialyse est nécessaire, nous avons essentiellement utilisé la deuxième technique, puisqu'après la dialyse on ne récupère que quelques % du zinc sérique. Dans ce cas, le traceur ^{65}Zn est donc mélangé au tampon.

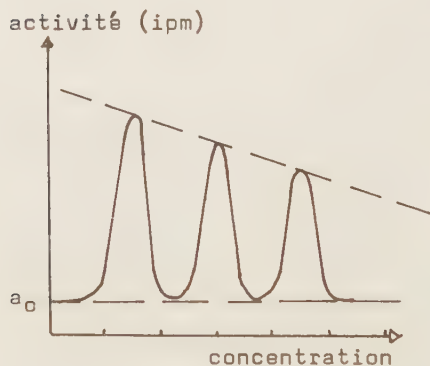


fig. 16a

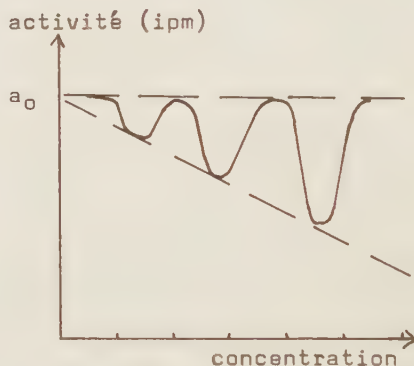


fig. 16b

figure 16 : courbes d'étalonnage

5.2.5. Evaluation des résultats de comptage

L'évaluation des résultats de mesure de radioactivité dépend du nombre d'échantillons par heure et du mode d'addition du traceur.

L'activité de la phase CCl_4 a été mesurée en continu. Nous avons choisi un intervalle de mesure de 0.1 min. L'impression du résultat et la remise du compteur à zéro prend 2.5 sec ; on obtient ainsi un résultat toutes les 8.5 secondes.

Pour 30 échantillons par heure, le passage d'un échantillon par le compteur dure 2 minutes, ce qui correspond à $(120 : 8.5) = 14$ valeurs. Pour 40 échantillons par heure, cela correspond à une moyenne de 10.5 valeurs par pic.

Lorsque le traceur est ajouté à l'échantillon, nous pouvons calculer la surface du pic, c'est-à-dire la somme des valeurs de chaque pic. Pour construire une courbe d'étalonnage, nous avons tracé ces sommes en fonction de la concentration des étalons dans un système linéaire (fig. 17a). Le blanc de l'appareil n'a pas été soustrait.

Pour une addition continue du traceur, c'est le minimum qui est important. Ainsi, nous avons calculé la moyenne des 6 valeurs minimum des 14 valeurs formant chaque pic pour 30 échantillons par heure ; pour 40 échantillons par heure c'était la moyenne des 2 valeurs minimum. Nous avons tracé (a/a_0) en fonction de la concentration de zinc dans un système linéaire (fig. 17b) ou dans un système logit-log (fig. 17c). a représente l'activité minimum par 0.1 minutes, et a_0 l'activité maximum, c'est-à-dire a_0 est l'activité qui est extraite si on met de l'eau désionisée à la place des échantillons.

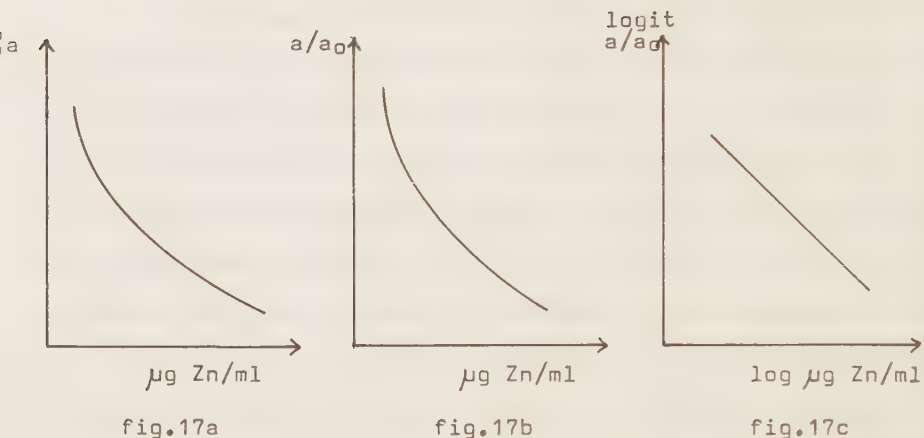


figure 17 : courbes d'étalonnage

Intégrateur

En vue d'une évaluation un peu plus rapide des résultats, nous avons branché sur le compteur un intégrateur avec un enregistreur qui nous aurait présenté les résultats sous la forme de courbes. Cette tentative n'a pas donné des résultats concluants.

5.2.6. Réactifs

Les réactifs étaient les mêmes que dans les parties précédentes de ce travail (voir p.33).

Solutions de dithizone : nous avons travaillé avec des solutions de HDz 1 à 10 μM . La stabilité de ces solutions ne pose pas de problèmes. La seule précaution que nous avons prise consistait à emballer le récipient et les bobines d'extraction dans une feuille d'aluminium, pour les protéger de la lumière. Pendant la durée d'une analyse (de 1 à 3 heures), nous avons, de temps en temps, prélevé un peu de solution de dithizone et

mesuré l'absorbance au spectrophotomètre : nous avons pu constater la stabilité des solutions.

La concentration de dithizone nécessaire pour extraire complètement une concentration donnée de zinc se calcule comme suit :

$$\mu\text{Mol HDz/l} = \frac{(\mu\text{Mol Zn/l}) \cdot (\text{débit Zn ml/min}) \cdot 2}{(\text{débit HDz ml/min})}$$

Cette formule ne donne qu'une approximation, puisque le débit de la solution de dithizone change avec l'usure du tube, et que la concentration de zinc influence la quantité extraite. Nous avons choisi les concentrations de HDz de telle sorte qu'elles soient suffisantes pour extraire environ 80 % du zinc de la solution la plus diluée de la série.

Mélange tampon-traceur : pour une addition continue du traceur, nous avons ajouté approximativement de 0.15 à 0.2 μC de ^{65}Zn sans entraîneur par ml de tampon masquant. Ce mélange est préparé juste avant l'emploi. Pour nous assurer de sa stabilité, nous avons comparé a_0 , l'activité du blanc, au début et à la fin d'une série d'extractions. En général, le mélange était stable ; dans quelques essais, nous avons pu observer une diminution de a_0 de quelques 10 %.

5.2.7. Etalons sériques

Pour les essais sur le sérum nous avons utilisé des standards dont la teneur en zinc avait été déterminée par absorption atomique :

LederNorm Lot 2905-428	1.1 $\mu\text{g Zn/ml}$	*
LabTrol Lot LT-520	0.7 $\mu\text{g Zn/ml}$	*
Séronorm Lot 128	0.9 $\mu\text{g Zn/ml}$	*
MoniTrol I Lot 144	2.13 $\mu\text{g Zn/ml}$	**
S ₁)	0.74 $\mu\text{g Zn/ml}$	**
S ₂) pools de sérums du labo	1.10 $\mu\text{g Zn/ml}$	**
S ₃)	1.54 $\mu\text{g Zn/ml}$	**

* : valeurs déterminées par M. Dogan du département de Chimie Minérale et Analytique, le 10.1.78

** : valeurs déterminées par le labo central de l'hôpital universitaire de Zurich, le 28.9.78.

5.3. Extractions de solutions aqueuses de zinc

5.3.1. Premiers essais avec un excès de dithizone

Ces essais ont pour but de vérifier qu'il y a une proportionnalité entre la concentration initiale de zinc de l'échantillon et la quantité extraite.

essai 155 : (colorimétrique)

- schéma: D
- 40 échantillons par heure ;
temps de prélèvement t_s : temps de lavage $t_w = 2 : 1$
- colorimètre : Standard Calibration = 8'00
(100 % $\approx$ 0,18 unités d'absorbance)
- dithizone 12 μM

<u>étalons :</u>	<u>densité opt.rel. :</u>
0.2 $\mu\text{g Zn/ml}$	30 %
0.4 $\mu\text{g Zn/ml}$	61 %
0.6 $\mu\text{g Zn/ml}$	91 %

essai 156 : (radiométrique):

Des solutions radioactives de zinc de concentrations différentes, mais de même activité spécifique, ont été extraites avec un excès de dithizone : l'activité extraite devrait donc être proportionnelle à la quantité de zinc dans l'échantillon.

- schéma : D
- 40 échantillons/heure ; $t_s : t_w = 2 : 1$
- dithizone 14 μM
- activité spécifique : 0.7 $\mu\text{C } ^{65}\text{Zn}$ par μg de zinc.

Nous avons calculé la somme des pics.

<u>étalons :</u>	<u>activité :</u>
0.2 µg Zn/ml	2282,2234,2475 counts
0.4 µg Zn/ml	3990,3934,4084,3980 counts
0.6 µg Zn/ml	5548,5519,5466,5692 counts
0.8 µg Zn/ml	6882,7017,6840,7257 counts
1.0 µg Zn/ml	8265,8228,8660,8341 counts

Jusqu'à 0.8 µg Zn/ml, l'activité extraite est donc proportionnelle à la concentration de zinc dans l'échantillon.

5.3.2. Optimisation du nombre des tours de la bobine d'extraction (T1).

Nous avons déterminé la longueur optimum de la bobine d'extraction. Quand on rallonge la bobine d'extraction, c'est-à-dire le temps de mélange des phases, la concentration du zinc dans la phase organique augmente et atteint finalement une valeur constante : la concentration d'équilibre. Le nombre minimum de tours qui ne change plus l'extraction est le nombre optimum que l'on cherche. Une addition de tours supplémentaires ne ferait que prolonger le temps de lavage nécessaire. Nous avons déterminé par colorimétrie le nombre optimum de tours supplémentaires à la bobine de mélange 157-8089 (10 tours).

essai 153 (colorimétrie)

- Schéma : A
- 40 échantillons/ heure ; $t_s : t_w = 2 : 1$
- colorimètre : Standard Cal. = 8'00 (100 % $\approx$ 0.18 u.d.a.)
- dithizone : 4.6 µM
- zinc : 1 µg/ml

<u>nombre de</u> <u>tours</u>	<u>densité optique</u> <u>relative</u>
10	56.5 %
20	58.5 %
30	63.5 %
40	64.0 %
50	66.5 %

essai 164

- schéma : D
- 40 échantillons/ heure ; $t_s : t_u = 2 : 1$
- colorimètre : Standard Cal. = 7'00 (100 % $\approx$ 0.22 u.d.a.)
- dithizone : 6.7 μM
- zinc : 1 $\mu\text{g/ml}$

<u>nombre de</u> <u>tours</u>	<u>densité optique</u> <u>relative</u>
0	a) - b) 74 %
5	76 % 74 %
10	77.5 % 75 %
15	77.5 % -
20	78 % 76 %
30	78.5 % -

Pour le schéma A, 30 tours semblent être l'optimum ; pour D, où la phase aqueuse est moins diluée, 20 tours auraient été suffisants. (fig. 18)

densité optique relative

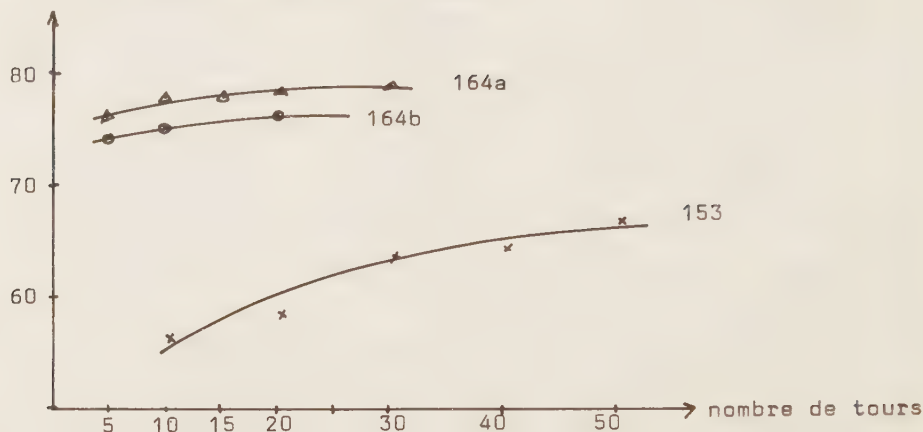


figure 18 : influence du nombre des tours

5.3.3. Essais substoechiométriques sur l'équilibre d'extraction

Dans les essais 152 et 157, nous avons vérifié encore une fois que l'analyse n'était pas strictement substoechiométrique, que les quantités extraites dépendaient de la concentration dans la phase aqueuse, et qu'un allongement de la bobine d'extraction n'y changeait rien.; ce n'est donc pas le temps de mélange des phases qui limite l'extraction.

essai 152 (colorimétrique)

- schéma : A
- 40 échantillons/ heure ; $t_s : t_w = 2 : 1$
- colorimètre : Standard Cal. = 4'00 (100 % = 0.38 u.d.a.)
- dithizone : 4.3 μM
- zinc : 1,2,3 $\mu\text{g Zn/ml}$

Nous avons ajouté des tours à la bobine de mélange 157-8089 :

densité optique relative :

	a) 20 t. HDz 4.3 μM	b) 30 t. HDz 4.6 μM	c) 40 t. HDz 4.6 μM	d) 50 t. HDz 4.6 μM
1.0 $\mu\text{g Zn/ml}$	23 %	28 %	27 %	26 %
2.0 $\mu\text{g Zn/ml}$	24.5 %	29 %	28 %	27.5 %
3.0 $\mu\text{g Zn/ml}$	25 %	29.5 %	28.5 %	28 %

Même à 50 tours, la densité optique n'est pas la même pour les différentes concentrations du zinc. Cela ne dépend donc pas du temps de mélange des phases.

essai 157 (radiométrique)

Des solutions de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 et 2.5 $\mu\text{g Zn/ml}$, ayant toutes la même activité spécifique, sont extraites avec une quantité substoechiométrique de dithizone. Nous avons calculé la somme des valeurs sur chaque pic.

- schéma : D
- 40 échantillons/ heure ; $t_s : t_w = 2 : 1$
- dithizone : 4.1 μM (extrait 0.16 $\mu\text{g Zn/min}$)
- activité spécifique : $\sim 0.28 \mu\text{C } ^{65}\text{Zn} / \mu\text{g Zn}$

étalons :

activité :

0.5 $\mu\text{g Zn/ml}$	1677,1658,1847,1900 counts
1.0 $\mu\text{g Zn/ml}$	2061,2188,2354,2427 counts
1.5 $\mu\text{g Zn/ml}$	2395,2331,2559,2666 counts
2.0 $\mu\text{g Zn/ml}$	2458,2723,2608,2849 counts
2.5 $\mu\text{g Zn/ml}$	2580,2809,2952,2958 counts

Ici encore, les activités extraites dépendent de la concentration dans la phase aqueuse. A part cela, il semble que le temps de lavage est trop court, puisque les premiers pics d'un groupe sont plus petits que les suivants.

5.3.4. Optimisation du temps de prélèvement de l'échantillon et du temps de lavage. (T1).

Pour une méthode colorimétrique, le temps de prélèvement de l'échantillon (t_s) et le temps de lavage (t_w) optimum sont aisés à déterminer. t_s est égal au temps que l'enregistreur met pour atteindre le plateau du pic plus environ 5 secondes pour le maintenir. t_w est le temps nécessaire pour redescendre à une valeur minimum reproductible qui ne doit pas forcément être la ligne de base (T1).

Pour la mesure digitale d'une activité, la valeur de la mesure qu'on obtient n'est pas constante, mais soumise à une erreur statistique. Le temps de prélèvement de l'échantillon t_s doit être suffisamment long pour permettre d'obtenir plusieurs valeurs comparables, minimum ou maximum, selon le mode d'addition du traceur. Plus on mettra de temps pour prélever l'échantillon, plus on obtiendra des valeurs de mesure et plus on pourra calculer le résultat avec précision. Le temps de lavage t_w doit permettre une séparation nette entre deux échantillons, sans entraînement de substance dans l'échantillon suivant ; le retour au blanc entre deux pics n'est pas nécessaire. Nous avons comparé les coefficients de variation de séries d'extractions obtenus avec des temps de prélèvement et de lavage variés.

t_s et t_w dépendent de la construction du circuit analytique et du détecteur, notamment :

- du volume de la spire de comptage et du débit du liquide radioactif : la spire doit être suffisamment petite pour

pouvoir contenir un seul échantillon à la fois. Dans notre appareil, la spire avait un volume de 0.5 ml, et la pompe amenait 0.7 ml de CCl_4 et 0.32 ml d'air par minute. (Nous avons essayé de mesurer des flux non segmentés : le rendement de comptage augmentait, mais la séparation entre deux échantillons devenait très mauvaise ;

- de l'intervalle de mesure (ici 0.1 min) : il doit être court par rapport au passage d'un échantillon ;
- de l'épaisseur du château de plomb, puisque le ^{65}Zn émet des photons de 1.115 MeV. La première et la dernière valeur d'une série sont souvent un peu plus grandes que les autres, si le traceur est ajouté au tampon ;
- du nombre de tours de la bobine d'extraction.

Avec les différentes cames de programmation que nous avons à disposition, nous avons extrait 10 fois la même solution de zinc et calculé les coefficients de variation (CV).

essai 158 : addition du traceur à la solution de zinc

Nous avons calculé la surface des pics, soit 10 valeurs sur chaque pic pour 40 échantillons/ heure, et 14 valeurs pour 30 échantillons/ heure.

- schéma : D
- dithizone : $8.5 \mu\text{M}$
- zinc : $1 \mu\text{g/ml}$.

a) 40 échantillons/h ; $t_s = 56$ sec, $t_w = 32$ sec (2 : 1)

3612 / 3800 / 3738 / 3722 / 3828 / 3827 / 3675 /
3716 / 3580 / 3792 counts.

$N = 10$ $\bar{x} = 3729$ counts $s = 86.6$ $CV = 2.3 \%$

b) 40 échantillons/h ; $t_s = t_w = 45$ sec (1 : 1)

3002 / 2447 / 3057 / 3159 / 3188 / 3209 / 3057 /
3124 / 3107 / 3093 counts.

$N = 10$ $\bar{x} = 3094$ counts $s = 81.7$ $CV = 2.6 \%$

c) 40 échantillons/h ; $t_s = 30$ sec, $t_w = 60$ sec (1 : 2)

2364 / 2300 / 2256 / 2263 / 2400 / 2336 / 2432 /
2291 / 2229 / 2342 counts.

$N = 10$ $\bar{x} = 2321$ counts $s = 65.4$ $CV = 2.8 \%$

d) 30 échantillons/h ; $t_s = 90$ sec, $t_w = 30$ sec (3 : 1)

(5515)/ 6065 / 6037 / 6129 / 6109 / 5982 / 6085 /
5915 / 5971 / 5911 counts

$N = 9$ $\bar{x} = 6022$ counts $s = 81.4$ $CV = 1.4 \%$

essai 184 : addition continue du traceur

Nous avons calculé la moyenne des valeurs minimum sur chaque pic.

- schéma : D pour les essais a) - e) : bobine d'extraction de 20 tours
D'pour les essais f) - h) : bobine d'extraction de 30 tours ;
- dithizone : $7.5 \mu M$
- zinc : $1 \mu g/ml$
- tampon-traceur : environ $0.17 \mu c$ $^{65}Zn/ml$.

a) 30 échantillons/h ; $t_s = 90$ sec, $t_w = 30$ sec (3 : 1)

moyenne des 6 chiffres minimum de 14 (impulsions/ 0.1 min)

494 / 474 / 497 / 496 / 483 / 477 / 478 / 486 / 494 / 471

$N = 10$ $\bar{x} = 485$ $s = 9.8$ $CV = 2.0 \%$

b) 40 échantillons/h ; $t_s = 60$ sec, $t_w = 30$ sec (2 : 1)

moyenne des 4 chiffres minimum de 10 (impulsions/ 0.1 min)

522 / 502 / 486 / 471 / 503 / 496 / 494 / 477 / 480 / 503

$N = 10$ $\bar{x} = 494.3$ $s = 15.2$ $CV = 3.1 \%$

c) 40 échantillons/h ; $t_s = t_w = 45$ sec (1 : 1)

moyenne de 3 chiffres minimum de 10

527 / 502 / 529 / 518 / 513 / 512 / 517 / 503 / 510 / 531

$N = 10$ $\bar{x} = 516$ $s = 10.2$ $CV = 2.0 \%$

d) 40 échantillons/h ; $t_s = 30$ sec, $t_w = 60$ sec (1 : 2)

moyenne de 2 chiffres minimum de 10

590 / 578 / 595 / 572 / 595 / 583 / 591 / 538 / 583 / 570

$N = 10$ $\bar{x} = 580$ $s = 17.0$ $CV = 3.0 \%$

e) 20 échantillons/h ; $t_s = 135$ sec, $t_w = 45$ sec (3 : 1)

moyenne de 11 chiffres minimum de 21

475 / 491 / 489 / 467 / 486 / 470 / 478 / 486 / 485 / 481

$N = 10$ $\bar{x} = 481$ $s = 8.1$ $CV = 1.7 \%$

f) 20 échantillons/h ; $t_s = 135 \text{ sec}$, $t_w = 45 \text{ sec}$ (3 : 1)

moyenne de 11 chiffres minimum de 21

477 / 477 / 462 / 472 / 469 / 461 / 465 / 463 / 449 / 457

$N = 10$ $\bar{x} = 465.2$ $s = 8.8$ $CV = 1.9 \%$

g) 30 échantillons/h ; $t_s = 90 \text{ sec}$, $t_w = 30 \text{ sec}$ (3 : 1)

moyenne de 6 chiffres minimum de 14

447 / 460 / 468 / 455 / 469 / 451 / 459 / 447 / 452 / 455

$N = 10$ $\bar{x} = 456.3$ $s = 7.7$ $CV = 1.7 \%$

h) 40 échantillons/h ; $t_s = 60 \text{ sec}$, $t_w = 30 \text{ sec}$ (2 : 1)

moyenne des 4 chiffres minimum de 10

474 / 470 / 459 / 467 / 463 / 457 / 482 / 453 / 466 / 461

$N = 10$ $\bar{x} = 465.2$ $s = 8.6$ $CV = 1.85 \%$

On peut en tirer les conclusions suivantes :

Les valeurs obtenues avec une bobine d'extraction de 20 tours sont un peu plus précises que celles obtenues avec une bobine de 30 tours ; la différence est toutefois minime. En général, la précision s'améliore avec une aspiration prolongée de l'échantillon ; les différences des coefficients de variation sont également minimes.

30 échantillons par heure et $t_s : t_w = 3 : 1$ nous semblent donner une précision acceptable. Si on diminue le nombre d'échantillons à 20 par heure, on consommera un volume plus élevé de réactifs et de l'échantillon sans obtenir de résultats substantiellement meilleurs. Avec la came de 30/h, nous n'avions pas la possibilité de prolonger le temps de lavage.

5.3.5. Stabilité des réactifs

Dans l'analyse automatisée, la stabilité des réactifs est plus importante encore que dans l'analyse manuelle, puisque les étalons et les échantillons inconnus ne sont pas extraits simultanément. Nous avons examiné la stabilité des solutions que nous pensions être les moins stables : de la solution de dithizone diluée et du mélange tampon masquant-traceur sans entraîneur.

a) dithizone

Les solutions de dithizone sont de l'ordre de 1 à 10 μM ; elles sont protégées contre la lumière. Au cours de plusieurs analyses, nous avons prélevé plusieurs échantillons de solutions de dithizone que nous avons mesurés au spectrophotomètre. Nous citons quelques exemples : (tableau 18)

essai	temps	densité optique	λ	concentration
160	15 ³⁰	0.230	619 nm	$\sim 7 \mu\text{M}$
	16 ⁵⁰	0.227		
	17 ⁴⁵	0.227		
181	15 ¹⁵	0.056	619 nm	$\sim 1.7 \mu\text{M}$
	16 ²⁰	0.056		
187 a)	12 ³⁵	0.181	620 nm	5.52 μM
	13 ⁵⁵	0.181		
b)	14 ¹⁰	0.184		
	15 ⁵⁰	0.184		

Nous n'avons donc pas eu de problèmes avec la stabilité de la dithizone.

b) mélange tampon-traceur

Nous avons comparé l'activité du blanc au début d'une série de mesures (a_0) et à la fin (a'_0). Quelques exemples :

essai	a_0	a'_0	a_0/a'_0
163	9040 c.	8926 c.	0.99
170	793 c.	787 c.	0.99
176	421 c.	395 c.	0.94

Dans l'essai 187, nous avons mesuré a_0 en fonction du temps :

<u>temps :</u>	<u>a_0 :</u>
12 ³⁰	11165 cpm
13 ⁰⁰	11250 cpm
13 ³⁰	11222 cpm
14 ⁰⁰	11380 cpm
14 ³⁰	11337 cpm
15 ⁰⁰	11369 cpm

Dans quelques cas, nous avons trouvé une diminution de a_0 de $\leq 10\%$, mais dans la plupart des essais a_0 était constant.

Les diminutions de a_0 pourraient être attribuées non seulement à des réactions chimiques dans le mélange tampon-traceur, mais aussi à des phénomènes d'adsorption sur le verre ou sur les tubes. Il est donc nécessaire de faire passer tous les réactifs dans le système pendant au moins 20 minutes avant de commencer les mesures.

Conclusions que l'on peut tirer des essais d'optimisation :

Les paramètres suivants sont recommandés, et nous les avons adopté pour les essais à venir :

- schéma : D ;
- 30 échantillons par heure ; $t_s : t_w = 3 : 1$;
- addition continue du traceur ;
- intervalle de mesure : 0.1 min. ;
- calcul de la moyenne des 6 valeurs minimum de chaque pic.

5.3.6. Série de courbes d'étalonnage avec des différentes concentrations de dithizone. (essai 183)

Nous avons enregistré 5 courbes d'étalonnage avec des solutions de dithizone entre 1 et 10 μM ; les étalons contenant 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 et 3.0 μg de zinc par ml.

Les résultats sont donnés dans le tableau 19 et dans la figure 19.

Si le coefficient de distribution est $\gg 1$, le zinc d'une solution contenant 0.5 $\mu\text{g/ml}$ devrait être extrait quantitativement au moyen d'une solution de HDz de 5.4 μM . Pourtant, on observe encore une diminution de a_0 avec une solution de HDz 6.9 μM (séparation non quantitative).

Entre 0.5 et 1.5 $\mu\text{g Zn/ml}$, la courbe obtenue avec HDz 6.9 μM est celle ayant la plus grande pente ; pour extraire des solutions contenant entre 0.5 et 1.5 μg de zinc par ml (sérum), on choisira donc des solutions de dithizone de environ 7 μM .

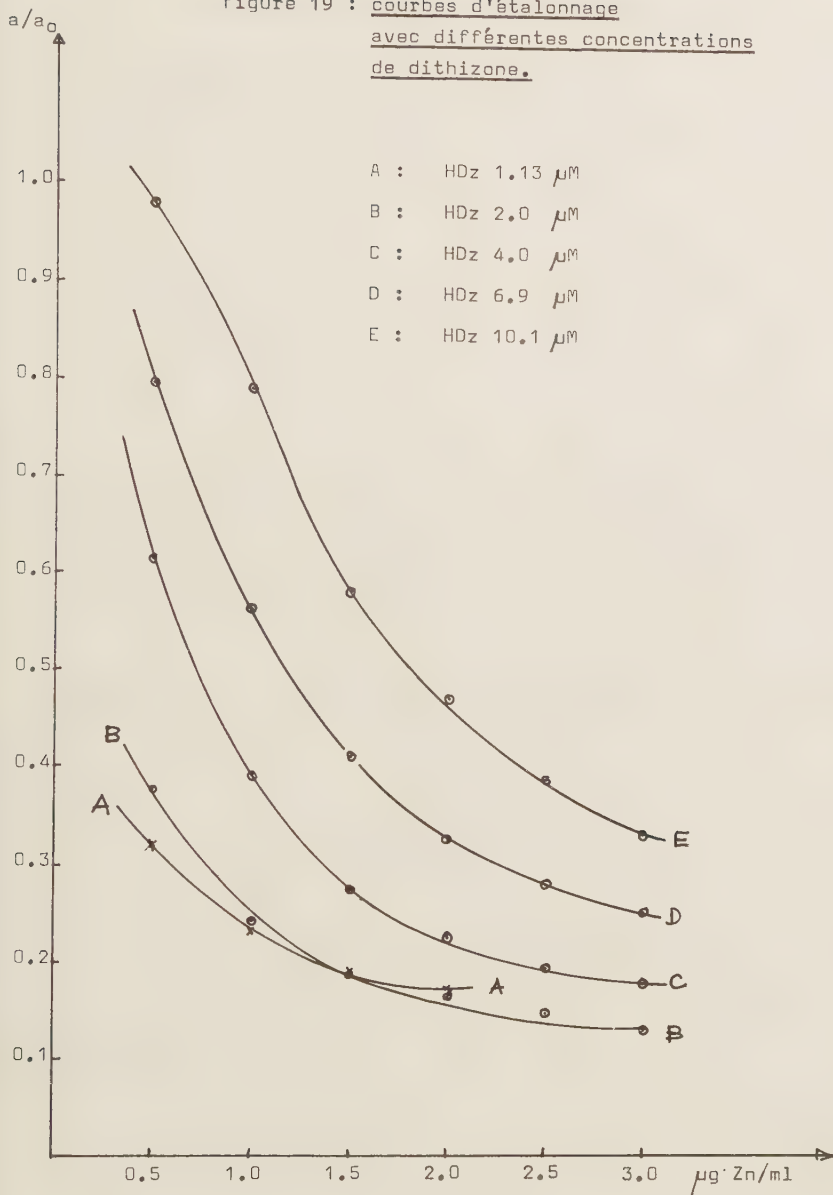
Tableau 19 : courbes d'étalonnage avec différentes concentrations de dithizone

<u>Zn</u>	<u>a) HDz = 1.13 μM</u>			<u>b) HDz = 2 μM</u>		
<u>μg/ml</u>	<u>c/0.1 min</u>	<u>$\bar{x}$</u>	<u>a/a₀</u>	<u>c/0.1 min</u>	<u>$\bar{x}$</u>	<u>a/a₀</u>
0.5	220,209,212	214	0.32	384,369,368	374	0.375
1.0	151,148,156	152	0.228	234,237,234	235	0.238
1.5	125,125,130	127	0.19	186,182,180	183	0.183
2.0	113,114,118	115	0.173	162,(144),166	164	0.165
2.5	-	-	-	147,147,143	144	0.145
3.0	-	-	-	132,124,133	130	0.13
a ₀	664	662		1042	995	
a' ₀	659			948		

<u>Zn</u>	<u>c) HDz = 4 μM</u>			<u>d) HDz = 6.9 μM</u>		
<u>μg/ml</u>	<u>c/0.1 min</u>	<u>$\bar{x}$</u>	<u>a/a₀</u>	<u>c/0.1 min</u>	<u>$\bar{x}$</u>	<u>a/a₀</u>
0.5	(734),694,685	690	0.616	981,964	973	0.795
1.0	434,437,448	440	0.39	(679),656,658	657	0.563
1.5	303,306,299	303	0.27	488,487,497	491	0.41
2.0	254,256,243	251	0.224	415,392,385	397	0.324
2.5	211,215,220	215	0.19	343,338,342	341	0.28
3.0	192,206,197	232	0.177	307,296,308	304	0.25
a ₀	1175	1118		1231	1225	
a' ₀	1060			1222		

<u>Zn</u>	<u>e) HDz = 10.1 μM</u>		
<u>μg/ml</u>	<u>c/0.1 min</u>	<u>$\bar{x}$</u>	<u>a/a₀</u>
0.5	1184,1160,1178	1174	0.98
1.0	950,949,949	950	0.79
1.5	692,(792),702	698	0.58
2.0	564,562,562	563	0.47
2.5	460,464,455	460	0.384
3.0	404,389,396	396	0.33
a ₀	1207	1198	
a' ₀	1188		

figure 19 : courbes d'étalonnage
avec différentes concentrations
de dithizone.



5.3.7. Spécificité (essai 188)

Nous avons examiné l'influence de quelques ions métalliques courants, constituant le sérum, à des concentrations comparables ou supérieures à celle du zinc, ou qui pourraient éventuellement contaminer les solutions.

Nous avons ajouté à 1 μg de zinc par ml :

- un excès de 10 μg de Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} ou de Hg^{2+} par ml ;
- un excès de 100 μg de Mg^{2+} ou de Ca^{2+} par ml.

La dithizone est 6.7 μM . Nous avons comparé les activités extraites ; la signification des différences a été examinée au moyen du test t selon Student. t a été calculé selon la formule (16) à la page 48. Les résultats sont donnés dans le tableau 20. (degrés de liberté : $2n - 2 = 6$)

Tableau 20 : interférence d'ions métalliques sur l'extraction

ajouté à 1 μg Zn/ml	imp./0.1 min	$\bar{x}$	s	n	t	p
—	701,678,691,671	685.25	13.37	4		
10 μg Fe	701,664,686,692	685.8	15.7	4	0.053	> 0.9
10 μg Cu	700,667,662,689	679.5	18.0	4	0.513	> 0.6
10 μg Pb	671,682,683,683	679.7	5.8	4	0.762	> 0.5
10 μg Hg	652,658,678,660	662	11.2	4	2.66	< 0.05
100 μg Mg	763,728,709,707	726.8	26.0	4	2.84	< 0.05
100 μg Ca	686,677,688,685	684.0	4.83	4	0.18	> 0.8

Conclusions :

- Fe, Cu, Pb et Ca ne donnent pas de différence significative ;
- Hg abaisse le taux d'extraction d'environ 3 % ;
- en présence de Mg, l'extraction augmente significativement.

Ces résultats confirment ceux décrits dans le chapitre 3.3.2.

5.3.8. Précision et exactitude (essais 161, 162, 189)

essai 161 : exactitude

Nous avons préparé trois solutions aqueuses "inconnues" de zinc que nous avons analysées :

- P₁ : 1.2 µg Zn/ml
- P₂ : 2.2 µg Zn/ml
- P₃ : 2.8 µg Zn/ml

La dithizone est 6.8 µM.

Résultats :

échantillon	c/0.1 min	$\bar{x}$	a/a ₀
étalons :			
1.0 µg/ml	1155, 1141, 1117	1138	0.53
1.5 µg/ml	838/832/836	835	0.388
2.0 µg/ml	675/662/668	668	0.31
2.5 µg/ml	550/549/555	551	0.256
3.0 µg/ml	501/506/473	493	0.23
P ₁	985/987/960		0.46/0.46/0.45
P ₂	618/612/622		0.29/0.285/0.29
P ₃	517/509/503		0.24/0.24/0.235
a ₀	2150		

Avec une courbe d'étalonnage logit/log, nous avons trouvé pour les solutions P₁, P₂, P₃ : (figure 20)

P₁ : 1.2/1.2/1.25 µg Zn/ml (1.2)

P₂ : 2.2/2.2/2.2 µg Zn/ml (2.2)

P₃ : 2.8/2.8/2.85 µg Zn/ml (2.8)

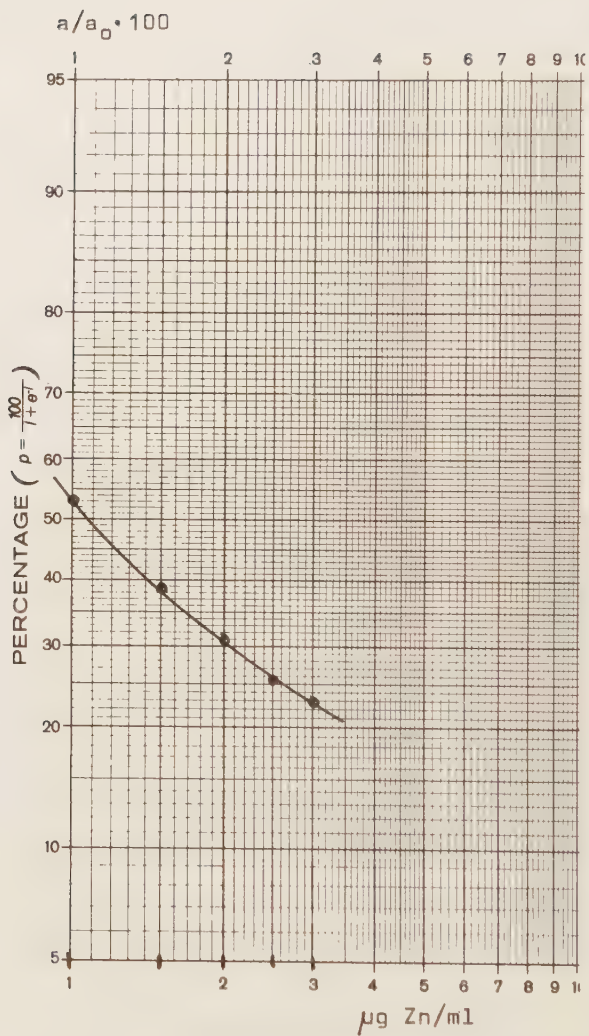


figure 20 : courbe d'étalonnage de l'essai 161

essai 162 : précision

Nous avons extrait 10 échantillons de 1 $\mu\text{g Zn/ml}$ et de 3 $\mu\text{g Zn/ml}$ avec une solution de dithizone 6.7 μM , et nous avons calculé le coefficient de variation.

Nous avons trouvé :

a) 1.0 $\mu\text{g Zn/ml}$:

1901 / 1867 / 1826 / 1850 / 1833 / 1865 / 1870 /
1853 / 1842 / 1818 counts/0.1 min

$N = 10$ $\bar{x} = 1852.5$ $s = 24.5$ $CV = 1.3 \%$

b) 3.0 $\mu\text{g Zn/ml}$:

784 / 790 / 780 / 786 / 775 / 756 / 785 /
796 / 757 / 768 counts/0.1 min

$N = 10$ $\bar{x} = 778$ $s = 13.5$ $CV = 1.75 \%$

essai 189 : précision et exactitude

Trois solutions aqueuses ont été extraites dix fois avec une solution de dithizone 7.7 μM ; le zinc était déterminé au moyen d'une courbe d'étalonnage. Les solutions aqueuses contenaient :

- P_1 : 1.2 $\mu\text{g Zn/ml}$
- P_2 : 1.8 $\mu\text{g Zn/ml}$
- P_3 : 2.2 $\mu\text{g Zn/ml}$

Le mélange tampon-traceur contenait environ 0.15 μC $^{65}\text{Zn /ml}$.

Nous avons compté les résultats suivants :

échantillons	imp./0.1 min	$\bar{x}$	a/a_0
étalons :			
1.0 $\mu\text{g Zn/ml}$	756,742,718	739	0.724
1.5 $\mu\text{g Zn/ml}$	531,536,527	531	0.52
2.0 $\mu\text{g Zn/ml}$	422,422,426	423	0.414
2.5 $\mu\text{g Zn/ml}$	348,347,353	349	0.342
solutions :			
P_1	622,634,613,632,649, 630,618,625,587,615	622.5	0.61
P_2	468,440,447,449,454, 453,457,445,444,462	452	0.442
P_3	389,378,368,371,386, 380,375,399	381	0.373

Résultats :

P_1 : $s = 16.4$ $CV = \underline{2.6 \%}$ $a/a_0 = 0.61 \rightarrow \underline{1.25 \mu\text{g Zn/ml}}$
 P_2 : $s = 8.67$ $CV = \underline{1.9 \%}$ $a/a_0 = 0.44 \rightarrow \underline{1.85 \mu\text{g Zn/ml}}$
 P_3 : $s = 10.2$ $CV = \underline{2.7 \%}$ $a/a_0 = 0.37 \rightarrow \underline{2.25 \mu\text{g Zn/ml}}$

5.4. Essais avec du sérum

Les essais avec le sérum n'ont pas donné des résultats satisfaisants. Cependant, nous allons décrire brièvement quelques-uns de ces essais et discuter les problèmes que nous avons rencontrés.

Pour séparer le zinc de sa liaison protéique, on peut choisir un procédé semi-automatique : le sérum est acidifié, déprotéinisé et centrifugé, et le surnageant est neutralisé "à la main", comme nous l'avons décrit dans le chapitre 4 (page 54,55).

Le procédé d'extraction du surnageant est alors automatisé. Une autre manière d'éliminer les protéines, de loin la plus élégante, est de dialyser le sérum acidifié. Puisque Technicon offre des systèmes de dialyse, nous avons essayé cette méthode.

5.4.1. Essais avec le dialyseur Technicon

La dialyse est simple, entièrement automatique, et évite les dangers de contamination de la déprotéinisation manuelle.

Cependant, le désavantage de la dialyse est que le rendement est faible, normalement de l'ordre de 1 à 10 %. (T1).

Le problème qui se posait donc, était d'obtenir un rendement suffisant et reproductible.

Premier essai : 166

Nous avons utilisé un schéma semblable à G, mais avec un seul dialyseur de 24 inches (61 cm). Le dialyseur était équipé d'une membrane en cellophane appelée "type C". Nous avons dilué les échantillons aqueux avec un volume identique de HCl 0.2 M. Comme on s'y attendait, le rendement fut très

faible ; au moyen d'un traceur, nous avons trouvé que 8 % de l'activité seulement passaient par la membrane.

Possibilités d'augmenter le rendement de la dialyse :

- on peut doubler l'efficacité de la dialyse en montant deux dialyseurs de 24 inches en série ;
- au lieu de diluer l'échantillon avec HCl 0.2 M, on peut ajouter un volume plus faible d'HCl, mais plus concentré ;
- on peut augmenter l'effet d'osmose : ainsi on peut dialyser l'échantillon de sérum contre une solution plus concentrée, par exemple contre une solution de NaCl 1.8 % (0.3 M), au lieu de dialyser contre de l'eau désionisée ;
- on peut utiliser des membranes spéciales du type H ayant une perméabilité supérieure. Elles sont très chères, et nous ne les avons pas utilisées.

essai 168 : dialyse contre H₂O et NaCl 1.8 % (colorimétrique)

- schéma : G
- 40 échantillons / heure ; $t_s : t_w = 2 : 1$
- colorimètre : Standard Cal. = 6'00 (100 % = 0.25 u.d.a.)
- dithizone : 4.6 μ M

densité optique relative

	<u>168a : H₂O</u>	<u>168b : NaCl</u> <u>1.8 %</u>	<u>166</u>
1 μ g Zn/ml	14.0 %	20.5 %	3 %
2 μ g Zn/ml	19.5 %	27.5 %	7 %
3 μ g Zn/ml	21.5 %	30 %	12 %
Séronorm	19 %	25.5 %	
LabTrol	14 %	18.5 %	

Dans l'essai 168b, nous avons un rendement de dialyse d'environ 3 à 4 fois plus grand que dans l'essai 166.

essai 173 : rendement de dialyse

Avec le schéma G (page 75), nous avons dialysé du sérum avec du traceur ^{65}Zn contre du NaCl 1.8 %. Nous avons trouvé que 25 % de l'activité passaient par la membrane de dialyse.

essais 171 et 174 : dialyse contre des solutions différentes

Le Zn^{2+} forme des complexes avec Cl^- . Nous avons dialysé une solution aqueuse acidifiée et du sérum acidifié contre des solutions de NaCl 0.2 M et 0.3 M et de NaClO_4 0.3 M. Nous avons comparé la densité optique du dithizonate extrait.

<u>essai 171 :</u>	<u>hauteur des pics en mm :</u>		
	<u>NaCl 0.2 M</u>	<u>NaCl 0.3 M</u>	<u>NaClO_4 0.3 M</u>
1 μg Zn/ml	60 mm	60 mm	64 mm
Séronorm	19 mm	18 mm	14 mm
pool de sérum	60 mm	60 mm	-

<u>essai 174 :</u>			
1 μg Zn/ml	56 mm	54 mm	65 mm
Séronorm	88 mm	97 mm	76 mm
pool de sérum	48 mm	49 mm	54 mm

Les différences sont minimes. Pour les solutions aqueuses, NaClO_4 0.3 M donne les meilleurs rendements de dialyse. Dans les sérums acidifiés, NaClO_4 0.3 M provoque une précipitation de protéines. Nous avons continué avec NaCl 0.3 M (1.8 %).

essai 170 : détermination du zinc dans les sérums au moyen
d'étalons aqueux

Nous avons déterminé le zinc dans du Séronorm avec des étalons aqueux de 1,2, et 3 $\mu\text{g Zn/ml}$. Les conditions étaient : schéma G (v.p.75), 30 échantillons par heure, $t_s : t_u = 3 : 1$, dithizone 3.8 μM , addition du traceur avec le tampon, pH de la phase aqueuse après la dialyse ≈ 8 . Les sérums et les étalons étaient 0.1 M en HCl.

Nous avons mesuré:	<u>a/a₀</u> :
1 $\mu\text{g Zn/ml}$:	0.46
2 $\mu\text{g Zn/ml}$:	0.34
3 $\mu\text{g Zn/ml}$:	0.28
Séronorm :	0.56 $\rightarrow$ <u>0.52 $\mu\text{g Zn/ml}$</u>

Pour le Séronorm, 0.9 $\mu\text{g Zn/ml}$ ont été déterminés par absorption atomique. Nous avons trouvé une activité trop grande pour le Séronorm, ce qui donne un résultat trop bas. La mesure colorimétrique indiquait également un pic trop grand par rapport aux étalons aqueux.

La vitesse de dialyse dépendant de la composition de la solution, nous avons continué les dosages avec des étalons sériques.

essai 178 : dosage du zinc avec des étalons sériques

Nous avons répété l'essai avec trois étalons sériques (v.p.84)

S_1 : 0.74 $\mu\text{g Zn/ml}$, S_2 : 1.10 $\mu\text{g Zn/ml}$, S_3 : 1.54 $\mu\text{g Zn/ml}$.

Nous avons trouvé pour différents sérums :

Séronorm :	1.35 $\mu\text{g Zn/ml}$	(AA : 0.90 $\mu\text{g/ml}$)
LederNorm :	1.40 $\mu\text{g Zn/ml}$	(AA : 1.1 $\mu\text{g/ml}$)
LabTrol :	1.4 $\mu\text{g Zn/ml}$	(AA : 0.7 $\mu\text{g/ml}$)
pool :	0.95 $\mu\text{g Zn/ml}$	(AA : 0.9 $\mu\text{g/ml}$)

Ces résultats n'étaient guère meilleurs comparés aux précédents. Nous avons alors entrepris d'autres déterminations avec de plus grandes concentrations de tampon, sans jamais trouver de résultats corrects.

Nous ne pouvons pas donner de raisons très valables à ces phénomènes. Les résultats trop élevés pourraient s'expliquer par l'extraction d'autres métaux du sérum, bien que le tampon devrait l'empêcher. La répétition de la dialyse était faible pour les sérums ; pour une extraction substoechiométrique, il serait important de connaître à peu près le rendement de dialyse.

5.4.2. Déprotéinisation manuelle (essais 181,186)

Nous avons acidifié les sérums avec HCl 0.2 M, précipité les protéines avec CCl_3COOH 20 %, centrifugé, neutralisé un volume aliquote avec NaOH 0.5 M (essai 181) ou avec NH_3 10 % (essai 186), et dilué au volume adéquat, comme nous l'avons décrit dans le chapitre 4 (page 54,55). Les mêmes quantités des mêmes réactifs ont été ajoutées aux étalons aqueux.

Nous avons trouvé : (essai 186) :

LederNorm :	1.0, 1.0, 1.05 $\mu\text{g Zn/ml}$	(AA : 1.1)
Séronorm :	1.25, 1.35, 1.4 " Zn/ml	(AA : 0.9)
MoniTrol I :	1.9, 2.0, 2.3 $\mu\text{g Zn/ml}$	(AA : 2.1)
LabTrol :	0.96, 0.78, 0.74 $\mu\text{g Zn/ml}$	(AA : 0.7)

Cette technique présente donc des résultats meilleurs. Il ne fait, néanmoins, encore doute qu'une étude systématique de l'automatisation de la déprotéinisation doit être réalisable. Cette étude pourrait faire l'objet de la suite de notre travail.

CHAPITRE 6

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons mis au point et décrit un dosage de zinc dans des solutions aqueuses et dans le sérum par extraction substoechiométrique à la dithizone. Nous avons établi et travaillé au moyen de courbes d'étalonnage. Nous avons adapté cette méthode à un procédé automatique de dosage (Technicon AutoAnalyzer). Alors que pour l'extraction automatique des solutions aqueuses nous n'avons pas eu beaucoup de difficultés, nous n'avons, par contre, pas pu résoudre le problème de l'automatisation de la déprotéinisation des sérums par dialyse.

Si nous nous posons la question d'une application pratique d'un dosage automatique, nous devons dire que la méthode présente dans l'état actuel des choses plusieurs désavantages face à d'autres méthodes tel que l'absorption atomique ou la spectrophotométrie :

- le blanc des réactifs ne peut pas être déterminé directement ;
- l'évaluation des résultats reste délicate (elle pourrait être simplifiée par exemple par l'utilisation d'un intégrateur) ;
- les compteurs à flux continu sont des instruments peu répandus, en tout cas dans les laboratoires médicaux ;
- le problème des déchets radioactifs n'est d'une manière générale pas résolu ;
- il faut un grand nombre d'échantillons pour que l'automatisation se justifie ;

- une détermination exige un volume relativement grand de l'échantillon : 1 à 3 ml de sérum ;
- le problème de la déprotéinisation automatique des sérums reste à résoudre.

La plupart de ces inconvénients sont cependant des problèmes pratiques et techniques qui pourraient être surmontés.

Par contre, les avantages de la méthode sont :

- la spécificité de la séparation substoechiométrique ;
- une méthode qui fait intervenir une séparation du zinc des protéines présente la possibilité de faire une distinction entre différentes fractions de zinc sérique, si cela se justifiait ;
- le dosage du zinc dans des solutions aqueuses donne des résultats valables . La méthode peut donc être adaptée à la détermination de cet élément dans d'autres matrices que le sérum.

Nous avons déterminé des teneurs en zinc d'environ $1 \mu\text{g}$ par ml. La méthode pourrait être modifiée pour le dosage dans des solutions plus diluées. La limite de sensibilité est fixée par la teneur en zinc des réactifs, ainsi que par la décomposition lente des solutions très diluées de dithizone.

BIBLIOGRAPHIE

- A 1 H. Adler, D. Burns, L. Snyder :
Continuous Extraction of Body Fluid Samples.
Technicon International Congress (1972)
- A 2 I.P. Alimarin, G.N. Bilimovitch :
Int. J. Appl. Radiation Isotopes 7, 169 (1960)
- A 3 L.D. Antoniou, R.J. Shalhoub, T. Sudhakar, J.C. Smith :
The Lancet II, 895 (1977)
- B 1 N.K. Baishiya, R. Heslop :
Crit. Reviews in Anal. Chem. 2, 345 (1971)
- B 2 C. Ballaux, R. Dams, J. Hoste :
Anal. Chim. Acta 35, 141 (1966)
- B 3 C.A. Bizollon :
Ann. Pharm. Françaises 23, 461 (1965)
- B 4 C.A. Bizollon, J. Garoux :
Ann. Biol. Clin. (Paris) 25, 869 (1967)
- B 5 C.A. Bizollon, R. Moret :
Journée de Radiochimie Analytique, Villeurbanne (France),
Institut de Physique Nucléaire de Lyon (1965) p.11
- B 6 H.J.M. Bowen :
IAEA SM-157/83 (1973)
- B 7 J.D. Boyett, J.F. Sullivan :
Metabolism 19, 148 (1970)

- B 8 T. Braun, L. Ladanyi, M. Marothy, I. Osgyani :
J. Radioanal. Chem. 2, 263 (1969)
- B 9 G.J. Brewer, A.S. Prasad (editors) :
Zinc Metabolism.
Alan Liss, New York (1977)
- B 10 G. Briscoe, B. Cooksey, J. Ruzicka, M. Williams :
Talanta 14, 1457 (1967)
- B 11 Rolf Bühler :
Metallothioneine : Zinkproteine aus menschlicher Leber.
Thèse Université de Zurich (1974)
- B 12 R.E. Burch, H. Hahn, J.F. Sullivan :
Clin. Chem. 21, 501 (1975)
- B 13 R.R. Burns, G.S. Fell :
Scot. Med. J. 21, 153 (1976)
- C 1 P. Carter :
Clin. Chim. Acta 52, 277 (1974)
- C 2 P. Carter :
Biochem. Med. 14, 378 (1976)
- D 1 I.T. Davies :
The Clinical Significance of the Essential Biological
Metals.
Heinemann, London (1972)
- D 2 J.B. Dawson, B.E. Walker :
Clin. Chim. Acta 26, 465 (1969)
- D 3 M F. Dunn :
Structure and Bonding Vol 23 p. 61
Springer, Heidelberg (1975)

- E 1 H. Eckert :
Naturwissenschaften 48, 429 (1961)
- E 2 A. Elek, H. Bogancs, E. Szabo :
J. Radioanal. Chem. 4, 281 (1970)
- F 1 B. Foley, S. Johnson, B. Hackley, J. Smith, J. Halstead :
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 128, 265 (1968)
- G 1 M.L. Girard :
Clin. Chim. Acta 20, 243 (1968)
- G 2 E.L. Giroux, R.J. Henkin :
Biochim. Biophys. Acta 273, 64 (1972)
- G 3 E.L. Giroux :
Biochem. Med. 12, 258 (1975)
- G 4 T. Günther, B. Ruhe, J. Schmalbeck, N. Tehrani :
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 327 (1974)
- G 5 F. Gurd, D.S. Goodman :
J. Am. Chem. Soc. 74, 670 (1952)
- H 1 J.A. Halstead, B.M. Hackley, J.C. Smith :
The Lancet II, 278 (1968)
- H 2 J.A. Halstead, J. Smith :
The Lancet I, 322 (1970)
- H 3 J.A. Halstead, J.C. Smith, I. Irwin :
J. Nutrition 104, 345 (1974)
- H 4 H. Hellwege, H. Schmalfuss, D. Goschenhofer :
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7, 56 (1969)

- H 5 H. Hellwege :
Klin. Wochenschr. 48, 1063 (1970)
- H 6 H. Hellwege :
Monatsschr. Kinderheilkunde 119, 37 (1971)
- H 7 H.L. Helwig et al :
Am. J. Clin. Path. 45, 160 (1966)
- H 8 S.R. Himmelhoch, H. Sober, B. Vallee, E. Peterson, K. Fuwa :
Biochemistry 5, 2523 (1966)
- H 9 F.L. Hoch, B.L. Vallee :
J. Biol. Chem. 181, 295 (1949)
- H 10 H. Holtmeier, M. Kuhn, C. Rummel :
Zink - ein lebenswichtiges Mineral.
Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft Stuttgart (1976)
- I 1 G. Iwantscheff :
Das Dithizon.
Verlag Chemie, Weinheim (2.Aufl. 1972)
- K 1 J. Kägi, B.L. Vallee :
J. Biol. Chem. 235, 3460, (1960)
- K 2 J. Kägi, B.L. Vallee :
Anal. Chem. 30, 1951 (1958)
- K 3 A.M. Kahn :
Am. J. Clin. Path. 44, 426 (1965)
- K 4 K. Kasperek, H. Schicha, V. Siller, L. Feinendegen, A. Höck :
IAEA SM-157/35 (1973)

- K 5 D. Keilin, T. Mann :
Biochem. J. 34, 1163 (1940)
- K 6 J.R. Kelson, J.R. Shamberger :
Clin. Chem. 22, 1218 (1976)
- K 7 K. Kudo, N. Suzuki :
J. Radioanal. Chem. 19, 55 (1974)
- K 8 K. Kudo, N. Suzuki :
J. Radioanal. Chem. 26, 327 (1975)
- L 1 C.G. Lamm, J. Ruzicka :
Joint FAO/IAEA Panel on Plant Nutrient Supply, Vienna,
27.11. - 1.12.67.
- L 2 C.G. Lamm, J. Ruzicka :
Talanta 16, 603 (1969)
- L 3 Zinc
The Lancet II, 268 (1968)
- L 4 A.R. Landgrebe, L. Mc Lendon :
NBS Technical Note 404, 170 (1965)
- L 5 A.R. Landgrebe, L. Mc Lendon, J. DeVoe :
Radiochemical Methods of Analysis Vol. II, p. 321
IAEA, Vienna (1965)
- L 6 Albert L. Lehninger :
Biochemie p.189
Verlag Chemie, Weinheim (2.Aufl. 1978)
- L 7 M. Lifschitz, I. Henkin :
J. Appl. Physiology 31, 88 (1971)

- L 8 R. Lindeman, M. Clark, J. Colmore :
J. Gerontology 26, 358 (1971)
- M 1 D.W. Margerum, F. Santacana :
Anal. Chem. 32, 1157 (1960)
- M 2 L.D. McBean, J.C. Smith, B. Berne, J. Halstead :
Clin. Chim. Acta 50, 43 (1974)
- M 3 D. Mikac-Devic :
Adv. Clin. Chem. 13, 271 (1970)
- M 4 E.J. Moynahan, J.P. Barnes :
The Lancet I, 676 (1973)
- M 5 E.J. Moynahan :
The Lancet II, 399 (1974)
- M 6 D. Mahler, J. Walsh, G. Haynie :
Am. J. Clin. Path. 56, 17 (1971)
- N 1 K.H. Neldner, M. Hambidge :
New England J. Med. 292, 879 (1975)
- P 1 A.F. Parisi, B.L. Vallee :
Biochemistry 9, 2421 (1970)
- P 2 - P 7 : G.A. Perezhogin, I.P. Alimarin :
Part 1 : J. Anal. Chem. UdSSR 25, 744 (1970)
Part 2 : " " 25, 902 (1970)
Part 3 : " " 25, 909 (1970)
Part 4 : " " 25, 1075 (1970)
Part 5 : " " 25, 1080 (1970)
Part 6 : " " 25, 1247 (1970)

- P 8 D. Perkins :
Biochim. Biophys. Acta 86, 635 (1964)
- P 9 M. Persigehl, A. Höck, K. Kasperek, E. Land, L. Feinendegen:
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 171 (1974)
- P 10 P. Pulido, J.H. Kägi, B.L. Vallee :
Biochemistry 5, 1768 (1966)
- P 11 A.S. Prasad, A. Miale, Z. Farid, H. Sandstead, A. Schulert:
J. Lab. Clin. Med. 61, 537 (1963)
- P 12 A.S. Prasad, D. Oberleas, J. Halstead :
J. Lab. Clin. Med. 66, 508 (1965)
- P 13 A.S. Prasad (editor) :
Zinc Metabolism.
Thomas, Springfield (1966)
- R 1 J. Reinhold :
Clin. Chem. 21, 476 (1975)
- R 2 J.F. Riordan :
Med. Clin. North America 60, 661 (1976)
- R 3 W. Roman :
Am. J. Clin. Nutr. 22, 1290 (1969)
- R 4 V. Rosenoer (editor) :
Albumin Structure, Function and Uses.
Pergamon Press, Oxford (1977)
- R 5 F. Rosner, P. Gorfien :
J. Lab. Clin. Med. 72, 213 (1968)

- R 6 J. Ruzicka :
Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 25, 199 (1960)
- R 7 J. Ruzicka, J. Stary :
Talanta 8, 228 (1961)
- R 8 J. Ruzicka :
Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 30, 1808 (1965)
- R 9 J. Ruzicka, M. Williams :
Talanta 12, 967 (1965)
- R 10 J. Ruzicka, J. Stary :
Talanta 14, 909 (1967)
- R 11 J. Ruzicka, J. Stary :
Substoichiometry in Radiochemical Analysis.
Pergamon Press, Oxford (1968)
- R 12 J. Ruzicka, C.G. Lamm :
Talanta 15, 689 (1968)
- R 13 J. Ruzicka, C.G. Lamm :
Talanta 16, 157 (1969)
- S 1 P Sadler :
Nature 262, 258 (1976)
- S 2 P. Schechter E. Giroux, J. Schlienger, V. Hoeniq,
J. Sjoerdsma :
Europ. J. Clin. Invest. 6, 147 (1976)
- S 3 V.J. Shamaev :
J. Anal. Chem. UdSSR 22, 1103 (1967)

- S 4 V.J. Shamaev, V. Kolotov :
J. Radioanal. Chem. 25, 107 (1975)
- S 5 A. Spears et al :
The Lancet II, 526 (1976)
- S 6 H. Spencer, B. Rosoff, A. Feldstein, S. Cohn, E. Gusmano :
Radiation Res. 24, 432 (1965)
- S 7 J. Sary, J. Ruzicka :
Talanta 18, 1 (1971)
- S 8 J. Sary, J. Ruzicka :
Talanta 8, 296 (1961)
- S 9 J. Sary, J. Ruzicka :
Talanta 15, 505 (1968)
- S 10 E. Sundal :
Schweiz. Rundschau Med. (Praxis) 67, 244 (1978)
- S 11 N. Suzuki, K. Kudo :
Anal. Chim. Acta 32, 456 (1965)
- S 12 H. Sarmini :
Sur quelques aspects de la biochimie du zinc :
liaisons protéines-zinc et intérêt clinique.
Thèse Université de Paris (1973)
- T 1 Automating Manual Methods using Technicon AutoAnalyzer
System Techniques (Technicon Manual TN1-0170-01)
- T 2 Technicon Bibliography 1967 - 1973
- T 3 J.H. Tipton, M. Cook :
Health Physics 9, 103 (1963)

- U 1 E.J. Underwood (editor) :
Trace Elements in Human and Animal Nutrition.
Academic Press (1971)
- V 1 B.L. Vallee, J. Rupley, T.L. Coombs, H. Neurath :
J. Am. Chem. Soc. 80, 4750 (1958)
- V 2 B.L. Vallee :
Physiol. Reviews 39, 443 (1959)
- V 3 B.L. Vallee, W. Wacker (editors) :
The Proteins. Vol. V : Metalloproteins.
Academic Press (1970)
- V 4 B.L. Vallee :
Trends in Biochem. Sciences 1, 88 (1976)
- V 5 C. Vrignaud, D. Ducassou, N. Vrignaud, P. Blanquet :
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 108, 169 (1969)
- V 6 C. Vrignaud, N. Vrignaud, P. Blanquet :
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 110, 138 (1971)
- W 1 H. Weiler :
Int. J. Appl. Radiation Isotopes 12, 49 (1961)
- W 2 K. Weismann :
Danish Med. Bull. 23, 146 (1976)
- W 3 G. Weitzel, A. Fretzdorff :
Z. Physiol. Chem. 292, 221 (1953)
- W 4 U. Weser, S. Seeber, P. Warnecke :
Biochim. Biophys. Acta 179, 422 (1969)

W 5 D.R. Williams :

The Metals of Life.

Van Nostrand (1971)

Z 1 B. Zak, R. Nalbandian, L. Williams, I. Cohen :

Clin. Chim. Acta 7, 634 (1962)

Z 2 I.E. Zimakov, G.S. Roshavskij :

Proceedings of the Commission on Analytical Chemistry,

Akad. Nauk UdSSR, Vol 9, 231 (1958)



